



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Microbiología e inmunología

**Genotipificación de virus de diarrea viral bovina
presentes en hatos lecheros**

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

TERESA DE JESÚS LÓPEZ PÉREZ

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA, FMVZ

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS PADILLA NORIEGA, IIB

DR. HUMBERTO MENDOZA RAMÍREZ, FMVZ

MÉXICO, D.F.

Agosto, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A mis padres quienes han sido mi guía durante toda la vida y son mi principal motor, gracias por todos sus consejos, sus palabras de aliento y su amor.

A mis hermanas y mejores amigas, Cindy, Carmen e Ivette, que me han apoyado a lo largo de éste camino, llamado VIDA, que han estado en cada paso y tropiezo y quienes no me dejaron darme por vencida en ningún momento.

A mi gran amiga, tutora, gurú de la ciencia ('maestro espiritual') y profesora, a ti Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, quien fuiste mi opción de seguir adelante en el posgrado, cuando estuve a punto de abortar ésta misión y de quien he aprendido mucho en éste andar entre los virus. Quién, además me contagio como un virus de su entusiasmo y dedicación... Gracias Rosa Elena por tu "Magivirus" (El primer virus mágico que ha existido, del que sus efectos van desde pequeñas desgracias mágicas a cuadros agudos de felicidad post infección)

Al Dr. Francisco Basurto quien logró que se desarrollara mi inmunidad innata y adaptativa.... De manera teórica, claro y quien me dio el mejor consejo: "Váyase con los buenos".

A la Maestra Laura Patricia Noé, con quien tuve mi primer contacto dentro del posgrado y siempre me ofreció y brindo su apoyo durante mi estancia en el. Gracias por sus "porras".

Al Dr. Gilberto Vaughan quien ha sido mi tutor a distancia en las buenas, malas y las peores, no importando la hora que sea.

A mi profesor, el MVZ Jorge Ávila quien activo mi "modo rumiante" (Cuando se está en modo rumiante, se lleva esa bola "X" que cada vez se hace más grande, de un lado a otro, se amasa, se nutre con nuevas ideas, se pasa a otro lado de la cabeza, se rumia un poco más, y cuando se cree que al fin va a ser expulsada, nos la tragamos otra vez). Que además con estas simples palabras: - ¡Si no te actualizas perezcos! Ayudaron a que estuviera en continuo aprendizaje de todo lo que implica la producción bovina, sobre todo la parte clínica de los bovinos.

A mis compañeritos del laboratorio y amigos, que se convirtieron en mi otra familia, después de pasar más tiempo con ustedes que con mi familia consanguínea, gracias por sesiones de estudio, juntas de esparcimiento (En el 76 y anexas) y charlas existencialistas: Naomi, Montsé, Mario, Irlanda, Marina, Pablo, Miguel, Moni, Ninnet, Nallely, Barushz, Cindy, Manuel, Enrique y a Pato.

A los técnicos y laboratoristas, Armando, Mario y Ale, por hacerse cargo de que funcione todo de lo mejor en el laboratorio.

A Bernardo, que llegó en el momento exacto.

Agradecimientos

Al instituto de Ciencia y tecnología del D.F (Icyt) por el financiamiento del proyecto con folio: **248/2010**.

Al Consejo nacional de ciencia y tecnología (Conacyt) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la producción y de la salud animal, de la FMVZ: LOPEZ PEREZ, TERESA DE JESUS. Núm. de CVU: 350882/ núm. de beca **240189**.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por su aceptación en su programa de posgrado, con el número de cuenta: **510020936**.

A mi comité tutorial: Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, Dr. Luis Padilla Noriega, Dr. Humberto Ramírez Mendoza quienes dirigieron el avance del proyecto.

A mi jurado: Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales, Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, Dra. Anaid Antaramian Salas, quienes contribuyeron al mejoramiento y ordenamiento del presente trabajo.

Al Dr. en Ciencias Gilberto Vaughan Figueroa, por su colaboración dentro del proyecto: **“Establecimiento del diagnóstico de las enfermedades respiratorias virales de los bovinos”** Proyecto 248/2010 y el desarrollo de la patente: **“Iniciadores para la identificación de virus del complejo respiratorio bovino mediante el uso de RT-PCR/PCR Multiplex en un solo tubo”** Folio: **MX/E/2012/081438**.

A la Q.F.B, Elvia Lazo García por el apoyo técnico y la asesoría en la calibración y manejo de los instrumentos de medición.

A la M.V.Z, Liliana Valdés Vázquez, por el apoyo técnico y asesoría en temas de bioseguridad, uso de gabinetes y campanas de flujo laminar.

Al Diseñador gráfico, Luis Rafael Cervantes Ramírez-Samperio, por la edición de esquemas e imágenes.



ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	9
II.I EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA	9
II.II ORGANIZACIÓN GENÓMICA	10
II.III REGIONES NO TRADUCIDAS 5' Y 3' (UTR 5' Y 3')	11
II.IV PROTEÍNAS DEL VIRIÓN	13
II.IV.I NPRO	14
II.IV.II C O CORE	14
II.IV.III ERNS (E0).....	15
II.IV.IV E1	16
II.IV.V E2.....	16
II.IV.VI P7	17
II.IV.VII NS2/NS3.....	18
II.IV.VIII NS4A Y NS4B.....	19
II.IV.IX NS5A Y NS5B	19
II.V REPLICACIÓN VIRAL	20
II.VI GENOTIPOS Y BIOTIPOS	23
II.VII VDVB Y SUS EFECTOS EN EL SISTEMA INMUNE	27
II.VIII EPIDEMIOLOGÍA Y SIGNOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD	33
II.IX DIAGNÓSTICO.....	37
II.IX.I AISLAMIENTO VIRAL.....	37
II.IX.II DETECCIÓN DE ANTÍGENO	38
II.IX.III DETECCIÓN DE ANTICUERPOS	39
II.IX.IV SERONEUTRALIZACIÓN	39
II.IX.V DETECCIÓN DE GENOMA	39
II.X CONTROL Y PREVENCIÓN	40
II.X.I VACUNACIÓN.....	41
III.OBJETIVOS	44
III.I OBJETIVO GENERAL	44
III.II OBJETIVOS PARTICULARES	44
IV. JUSTIFICACIÓN	45
V. MATERIAL Y MÉTODOS	46

V.I VIRUS Y LÍNEAS CELULARES	46
V.II CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR MDBK (MADIN DARBY BOVINE KIDNEY, CATÁLOGO CCL-22 DE ATCC)	46
V.III CONTEO CELULAR	47
V.IV PROPAGACIÓN DE VIRUS DE REFERENCIA	48
V.V TITULACIÓN DE VIRUS POR EL MÉTODO DE DOSIS INFECCIOSA 50 (DICT ₅₀ / DI ₅₀) .	49
V.VI VIABILIDAD CELULAR POR LIBERACIÓN DE CRISTAL VIOLETA.....	50
V.VII EXTRACCIÓN DE RNA VIRAL DE VACUNAS COMERCIALES POR EL MÉTODO DE TRIZOL	51
V.VIII VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA Y CUANTIFICACIÓN	52
V.IX SÍNTESIS DEL cDNA MÉTODO DE TRANSCRIPTOR ROCHE	53
V.X SÍNTESIS DEL cDNA MÉTODO DE SUPERSRIPT™ II REVERSE TRANSCRIPTASE. 54	
V.XI ESTANDARIZACIÓN DEL RT-PCR DE REGIÓN UTR 5' UTILIZANDO LOS VIRUS DE REFERENCIA.....	55
V.XII TOMA DE MUESTRAS CLÍNICAS, SANGRE TOTAL Y MUESCA DE OREJA.....	55
V.XIII SEPARACIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE TOTAL MEDIANTE EL MÉTODO DE LYMPHOPREP	56
V.XIV AISLAMIENTO VIRAL	57
V.XV EXTRACCIÓN DE RNA DE MUESTRAS CLÍNICAS POR MÉTODO DE TRIZOL.....	58
V.XVI PURIFICACIÓN DE RNA OBTENIDO A PARTIR DE LAS BIOPSIAS DE OREJA POR COLUMNA (QIAAMP® MINELUTE® VIRUS SPIN, QIAGEN).....	59
V.XVII DISEÑO DE CEBADORES PARA REGIÓN UTR 5', ERNS-E1 (E0-E1) Y BACTINA BOVINA	60
V.XVIII ESTANDARIZACIÓN DEL RT-PCR DE MUESTRAS CLÍNICAS	63
V.XIX ESTANDARIZACIÓN DEL RT-PCR ANIDADA DE ERNS Y E1.....	64
V.XX PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR MEDIANTE QIAQUICK GEL EXTRACTION .	65
V.XXI PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS POR PCR MEDIANTE E-GEL® AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS SYSTEM (INVITROGEN).....	66
V.XXII SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	67
V.XXIII DEPURACIÓN DE ELECTROFEROGRAMAS Y DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA .	67
VI. RESULTADOS	68
VI.I MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR Y PROPAGACIÓN DE VIRUS DE REFERENCIA	68
VI.II TÍTULO VIRAL DE CEPA NADL POR DICT ₅₀ EN MDBK	69
VI.III VIABILIDAD CELULAR DEL VIRUS DE REFERENCIA.....	70
VI.IV OBTENCIÓN DE RNA.....	71
VI.V AMPLIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN UTR 5' VI.V.I VACUNAS..	71
VI.VI MUESTRAS CLÍNICAS.....	73
VI.VI.I LINFOCITOS EN SANGRE	73
VI.VI.II LAVADOS DE MUESCAS DE OREJA	75
VI.VI.IV MUESCAS DE OREJA.....	75

VI.VII AMPLIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN ERNS-E1 (E0-E1)	76
VI.VIII.I MUESCAS DE OREJA	76
VI.VIII AISLAMIENTO VIRAL	77
VI.IX TÍTULO DICT ₅₀ DE LOS VIRUS AISLADOS	80
VI.X VIABILIDAD CELULAR DE VIRUS AISLADOS EN MDBK	81
VI.XI PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE PCR	82
VI.XII ANÁLISIS DE SECUENCIAS Y CONSTRUCCIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO	83
VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	86
VIII. LITERATURA CITADA	90
IX. ANEXOS	107
ANEXO 1. REGISTRO DE LA PATENTE MX/E/2012/081439, “INICIADORES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DEL COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO MEDIANTE EL USO DE RT-PCR/PCR MULTIPLEX EN UN SOLO TUBO”	107
ANEXO 2. SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR DEL MÚLTIPLEX, ESTANDARIZADO CON VACUNAS COMERCIALES: MX/E/2012/081439. ...	108
ANEXO 3. FRACCIONAMIENTO ELECTROFORÉTICO DE LOS PRODUCTOS DE PCR DEL MÚLTIPLEX: MX/E/2012/081439. CONTROL DE CALIDAD DEL SUERO FETAL EQUINO, UTILIZADO EN LOS ENSAYOS DE INFECCIÓN.	108
ANEXO 4. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS DE LA SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE LA UTR 5' (MUESTRAS: 01, 02, 03)	109
ANEXO 5. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS DE LA SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE LA UTR 5' (MUESTRAS: 04, 05, 07)	110
ANEXO 6. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS DE LA SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE LA UTR 5' (MUESTRAS: 08, 09, 10)	111
ANEXO 7. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS DE LA SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE LA UTR 5' (MUESTRAS: 12, 14, 15)	112
LISTA DE TABLAS	113
LISTA DE FIGURAS	113

Resumen

El virus de la Diarrea viral bovina (VDVB) causa diversos cuadros clínicos, afectando al aparato respiratorio, digestivo y reproductivo de los bovinos, principalmente. Es causante de abortos en hembras gestantes o el nacimiento de becerros persistentemente infectados (PI). Forma parte del complejo respiratorio y abortivo de los bovinos (CRB), que a nivel mundial tienen una gran importancia económica. En México se conoce poco acerca de la prevalencia de los agentes infecciosos que causan enfermedad respiratoria y abortos en ganado bovino los cuales reportan una seropositividad del 71% al 80% en producciones lecheras y de carne en al menos 7 estados del país, pero no existen reportes acerca de las características genéticas de los virus. En éste contexto se realizó una caracterización genómica de los virus del VDVB, presentes en bovinos recién nacidos de la Cuenca lechera de Tizayuca. Se colectaron 21 muestras de sangre total y de muescas de oreja; la primera para realizar de un RT-PCR a partir de RNA obtenido de los leucocitos, que amplifica un fragmento de la región 5' no traducida (UTR 5', por sus siglas en inglés Untranslated region), considerada la región más conservada para los virus de VDVB y la segunda para el aislamiento viral en cultivo celular, además de la amplificación de un RT-PCR anidado que amplifica una región variable entre Erns y E1. Se logró amplificar la UTR 5' conservada (62%) en 13 muestras sanguíneas y en cada caso se realizaron co-cultivos, utilizando las muescas como inóculo en células MDBK. En 5 muestras se observó efecto citopático después de 4 pases en cultivo celular y se confirmó la presencia de VDVB por RT-PCR. Los amplicones fueron purificados y secuenciados, observándose similitud mayor al 96%, con virus del genotipo I de VDVB. Finalmente, se realizó la amplificación de Erns y E1, la región variable, resultando positivos 13, de los 21 animales muestreados.

Palabras clave: VDVB, Genotipificación, UTR 5', Erns, E1, RT-PCR, Aislamiento viral, Diagnóstico.

Abstract

The bovine viral diarrhea virus (VDVB) causes a variety of clinical conditions affecting the respiratory, digestive and reproductive systems in cattle. BVBV causes abortions in pregnant cows or the birth of persistently infected calves (PI), and is one of the etiologic of respiratory and abortive complex in cattle (CRB), which is globally of great economic importance. In Mexico there are few reports of to VDVB seropositivity ranging from 71 to 80% in dairy and beef production in at least 7 states of the country, knowledge about the prevalence of infectious agents that cause respiratory disease and abortions in cattle is poor. In this context we performed a genomic diagnosis and characterization of VDVB in bovine newborns. Whole blood and ear notches samples were collected of 21 newborns, and diagnostic by RT-PCR performed from RNA obtained from leukocytes, amplifying a fragment of the 5' untranslated region (5' UTR), considered the most conserved region of genome for VDVB, in addition ear notches were obtained for virus isolation in cell culture, and for amplification by RT-nested PCR amplification of a variable region between Erns and E1. We diagnosed 13 (62%) newborns as positive for VDVB by RT-PCR amplification of the conserved region of the viral genome (Blood samples). In addition by performing co-cultures using the notches as inoculums in MDBK cells, cytopathic biotypes were identified 5 positives after 4 passages and the presence of the virus was confirmed by RT-PCR of 5' UTR in each case. The amplicons were purified and sequenced, and presented similarity (>96%) with the genotype I of VDVB. Finally we performed the amplification of the variable regions Erns and E1 amplification, was positive in 13 of the 21 animals.

Keywords: VDVB, genotyping, UTR 5', Erns, E1, RT-PCR, Virus Isolation, Diagnosis

Lista de abreviaturas y siglas usadas

ARN Ácido Ribonucleico

ATPasa Enzima que produce la hidrólisis del Adenosín Trifosfato (ATP)

BDV Virus de la enfermedad de las fronteras de los ovinos (Border disease virus)

BoHV1 Herpes virus bovino tipo 1 (Bovine Herpes virus – 1)

BPIV3 Parainfluenza bovina tipo 3 (Bovine Parainfluenza virus – 3)

BRSV Virus sincitial respiratorio bovino (Bovine Respiratory Sincitial Virus)

C3b y C4b Opcioninas (opsonizan los antígenos y solubilizan los complejos inmunes)

CBP/p300 Proteína co- activadora de la transcripción juegan un papel central en la coordinación y la integración de múltiples eventos dependientes de señales para la transcripción, en respuesta a diversas señales fisiológicas que como la proliferación, diferenciación y apoptosis.

CCP Invaginación revestida de Clatrina (Clathrin-Coated Pit)

CCV Vesícula revestida de Clatrina (Clathrin-Coated vesicle)

CD46 Receptor celular que regula la activación del complemento.

CME Endocitosis mediada por Clatrina (Clathrin-mediated endocytosis)

COOH Grupo funcional carboxilo

CP Citopático

CRB Complejo respiratorio bovino

CSFV Virus de la Fiebre Porcina Clásica (Classical Swine Fever Virus)

Cys Cisteína (Cysteine)

DNM1 y 2 Dinamina. Cuando una vesícula invagina la dinamina forma una espiral alrededor del cuello de la vesícula y la libera (Dynamin-1/2)

E1 y E2 Glicoproteínas de anclaje de los pestivirus, que pueden formar heterodímeros.

eEF1A Factor-1 traduccional de elongamiento

Erns Glicoproteína pestiviral encontrada en la superficie del virión.

ESCRT Complejos ESCRT son utilizados normalmente por la célula para las funciones biológicas que implican remodelación de la membrana, tales como la formación de vesículas intraluminales y la autofagia. La familia ESCRT consiste ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II que participan principalmente en la clasificación y endocitosis de proteínas (Endosomal sorting complex required for transport)

Glu Ácido Glutámico

HCV Virus de la Hepatitis C (Hepatitis C virus)

His Histidina

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

Hsc70 Proteína de choque térmico que funciona como una ATPasa en el desmontaje de las vesículas revestidas de clatrina durante el transporte de componentes de la membrana a través de la célula. (Heat Shock Cognate Protein 70)

ICTV Comité internacional en taxonomía viral (International Committee on Taxonomy of Viruses)

IFN I Interferón de tipo I

IRES Sitio de entrada e internalización al ribosoma (Internal Ribosome-Entry Sites)

IRF3 Factor de transcripción involucrado en la síntesis de interferon (Regulatory Transcription Factor 3)

ISGs Genes que regulan el sistema inmune, involucrados con la síntesis de IFN (Interferon-stimulated genes)

KDa Kilodalton es una unidad de masa molecular

LDL Lipoproteína de baja densidad (Low Density Lipoprotein)

MAbs Anticuerpos monoclonales (Monoclonal antibodies)

MD Enfermedad de las mucosas (Mucosal Disease)

NCP No citopático

Npro Proteína no estructural, encontrada únicamente en los pestivirus

N-Terminal Amino terminal

ORF Marco de lectura abierto (Open Reading Frame)

p7 Proteína de enlace entre las proteínas estructurales y las no estructurales de los pestivirus

PGE2 Prostaglandina E2, prostanoide implicado en la inflamación.

pH Potencial de Hidrógeno

PI Persistentemente infectado

PMN Polimorfonuclear

PNS Sustituciones de nucleótido palindrómico (Palindromic Nucleotide Substitutions)

PV1, 2, 3 Las tres regiones variables o palíndromos específicos

RE Retículo endoplásmico

RNAm Ácido ribonucleico mensajero

Ser Serina

TLR Receptores tipo Toll (Toll like receptors)

UTR Región no traducida (Untranslated region)

V1, V2 y V3 Las tres regiones variables o palíndromos específicos

VDVB Virus de la Diarrea Viral Bovina

I. Introducción

El virus de la Diarrea viral bovina (VDVB) es un agente infeccioso que causa diversos cuadros clínicos de agudos a mortales, afectando al aparato respiratorio, digestivo y reproductivo de los bovinos, principalmente. También es causante de abortos en hembras gestantes y becerros nacidos inmunotolerantes, persistentemente infectados (Fulton *et al.*, 2005). Tiene importancia económica a nivel mundial, ya que representa pérdidas reproductivas y productivas, que se traducen en altas pérdidas económicas; por estar ampliamente distribuido, tiende a ser endémico en la mayoría de las poblaciones bovinas (Kim y Duvobi, 2003, Ammari *et al.*, 2010). Diferentes países reportan niveles que van de 0.5 a 2% y hasta el 6% de bovinos persistentemente infectados (PI) y 60 a 80% de bovinos seropositivos (Lértora, 2003, Bachofen *et al.*, 2008, Vargas *et al.*, 2009). En México, se tienen registros de seropositividad que van del 71% al 80% en producciones lecheras y cárnicas, en al menos 7 Estados del país (Correa *et al.*, 1975 y Suzan *et al.* 1983) mientras que en un estudio reportado por Solis-Calderon *et al.* (2005) en el estado de Yucatán reveló una seropositividad del 14% en bovinos de carne, Córdova-Izquierdo *et al.* (2009) determinó la seropositividad contra el VDVB y otros virus del complejo respiratorio bovino (CRB) en animales sin vacunar, de los trópicos húmedos de México y es cercana a 90% para el VDVB. Segura-Correa *et al.*, 2010 reporta una incidencia de la seroconversión en Michoacán del 16.4%, en las temporadas de muestreo, en hatos lecheros donde no se practica la vacunación (Noviembre, 2000 a Septiembre, 2001 y Diciembre, 2001 a Noviembre, 2002) y una seroprevalencia del 63.2%, además menciona que el impacto económico es de \$937 a \$1100 dólares por aborto. Otros estudios mencionan que infecta a otras especies como, ovinos, caprinos, camélidos, jirafas, cerdos, ciervos y otras especies del orden artiodactyla, al haber detectado anticuerpos neutralizantes contra el VDVB, así como el aislamiento del virus a partir de muestras clínicas (Celedón *et al.*, 2006, Rondón, 2006, Reza, 2010, Casaubon *et al.*, 2012).

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

En México se sabe poco acerca de los agentes infecciosos que causan enfermedad respiratoria y abortos en ganado bovino, se estima que permanecen como desconocidas las causas en ambos casos. Meléndez *et al.* (2010) reporta que en más de un 70 % de los casos de abortos no se determina la causa. Aunado a esto, existen pocos estudios que revelen la prevalencia real y la diversidad de cepas circulantes presentes en el ganado bovino y en otras especies susceptibles a la infección por VDVB, ya que sólo se tienen reportes de al menos 7 estados de la República de Mexicana (Escamilla *et al.*, 2007).

Con la finalidad de identificar al VDVB, se han desarrollado técnicas de diagnóstico, basadas en el aislamiento directo del virus en cultivo celular, detección del antígeno viral por métodos como inmunohistoquímica e inmunoensayos, utilizando un panel de anticuerpos monoclonales (mAbs), sin embargo no ha sido suficiente, ni determinante para diferenciar entre genotipos de VDVB y de otros pestivirus. El uso de técnicas de biología molecular tales como el RT-PCR, ha facilitado el diagnóstico y detección de los virus, así como una clasificación adecuada (Vilcek, 1994, Young, 2006), para el VDVB se han utilizado iniciadores que amplifican la secuencia UTR 5', ya que está altamente conservada en estos virus (Bolin y Ridpath, 1998) y otras regiones variables para identificar los subgenotipos como Npro, Erns, E1 y E2 (Giammarioli *et al.*, 2008). El virus de la diarrea viral bovina tiene una gran diversidad genética que está dividida en 2 genotipos el I y II de los que a su vez se subdividen en subgenotipos: 12 subgenotipos reportados del genotipo I (a – l) y 2 para el genotipo 2 (a y b), además se ha reportado actualmente un genotipo 3, el cual es un genotipo tentativo, que aún no está aceptado por el comité internacional en taxonomía viral (ICTV-International Committee on Taxonomy of Viruses) (Peterhans *et al.*, 2010, Decaro *et al.*, 2011, Xia *et al.*, 2011). Esta diversidad genética del VDVB está asociada con la propensión de los virus de RNA a modificaciones genómicas como mutaciones y recombinaciones (Peterhans *et al.*, 2010). La clasificación genotípica está basada en la divergencia de las secuencias genómicas virales, reveladas por los análisis filogenéticos, en las que se calculan las distancias y sustituciones genéticas (Ridpath y Bolin, 1995 y Vilcek *et al.*, 2001).

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

Para el control del virus de la diarrea viral bovina, existen diversas vacunas de virus activo y vacunas de virus inactivo, en las que la mayoría sólo se refiere que contiene virus citopático, no citopático del tipo I y II, además de los otros virus del complejo respiratorio bovino: Herpes virus tipo I (BoHV1), Parainfluenza bovina tipo 3 (BPIV3) y Virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) aprobados por SAGARPA (PLM,2012) existen del mismo modo diversos programas de vacunación, de los que se recomienda de manera general, la siguiente forma: La vacunación contra VDVB en becerras de reposición debe hacerse de los 4 a los 8 meses de edad, una segunda vacunación a las 4 semanas con virus activo modificado y revacunar a los 13 meses de edad antes del servicio. Las vacas adultas se recomiendan vacunarlas con virus inactivo y revacunar de 3 a 4 semanas después, cada 6 meses o cada año (Ávila y Cruz, 2011: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/bovinotecnia/BtRGClig0020.pdf>)

Si embargo la utilización de vacunas parece ser poco eficaz ya que no hay evidencia de una reducción significativa en la seropositividad, de los casos reportados con signos clínicos de la enfermedad y por lo tanto no se ha podido establecer un control de la infección (Vargas *et al.*, 2009), creando además un riesgo de recombinación entre las cepas vacúnales y las cepas de campo. (Reza, 2010, Pogranichniy *et al.*, 2011). Dentro de éste contexto se planteo como objetivo principal, realizar una caracterización genotípica de las especies circulantes del VDVB, presentes en bovinos recién nacidos. Se colectaron muestras de sangre total y muescas de oreja; la primera para la realización de un RT-PCR a partir de RNA obtenido de los leucocitos, que amplifica para un fragmento de la región 5' No traducida (UTR 5'), considerada la región más conservada para los virus de VDVB y la segunda para el aislamiento viral en cultivo celular. Se logró el aislamiento viral en 5 muestras de 13 muescas. Resultaron 13 becerras de 21 positivas por RT-PCR (62%), de las que se realizaron co-cultivos a partir de las muescas, en células MDBK. Se logró identificar biotipos citopáticos que posteriormente, fueron utilizados para un RT-PCR de la UTR 5', los fragmentos fueron purificados y secuenciados y revelaron una similitud con virus de VDVB del tipo I, al tener 99% de identidad con virus reportados en las bases de datos del

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

GenBank. Adicionalmente se realizó un RT-PCR anidado para una región que corresponde a Erns y E1 con el objetivo de conocer el subgenotipo de los virus obtenidos en éste proyecto. Se detectó por un análisis bioinformático BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) genotipos I y II.

Se propone un nuevo diseño de los iniciadores para otras regiones variables, que incluyan subgenotipos reportados en América, así como la genotipificación completa de los virus y conocer las características antigénicas de los virus que circulan en México, con la finalidad de establecer un diagnóstico adecuado en la identificación de ésta especie viral.

La tipificación genética es importante para clasificar de una manera precisa y para generar información que coadyuve a prevenir y controlar brotes de VDVB, mediante el desarrollo de estrategias efectivas ya que existe una gran diversidad genética de ésta especie viral y los programas de vacunación existentes y disponibles no han sido satisfactorios (Sarıkaya *et al.*, 2012)

II. Revisión de la literatura

ii.i El virus de la Diarrea viral bovina

El virus de la Diarrea viral bovina fue reportado por primera vez en 1946, causando severas infecciones gastrointestinales, respiratorias y reproductivas en ganado bovino (Tan *et al.*, 2006). En la última década se han detectado brotes severos de enfermedad causados por VDVB-2 en EE.UU, Gran Bretaña, Francia, Canadá, Brasil e Israel (Ronchi *et al.*, 2001, Lunardi *et al.*, 2008, Friedgut *et al.*, 2010). En México la información se limita a la seroprevalencia de la enfermedad, en al menos 7 estados del País, en el ganado bovino y en otras especies susceptibles a la infección por VDVB y no se tienen reportes acerca de las cepas virales de VDVB (Escamilla *et al.*, 2007). Como ya se mencionó, en México, se tienen registros de seropositividad que van del 71% al 80% en producciones lecheras y cárnicas, (Correa *et al.*, 1975 y Suzan *et al.*, 1983) mientras que en un estudio reportado por la investigación de Solis-Calderon y colaboradores (2005), el estado de Yucatán reveló una seropositividad del 14% en bovinos de carne, Córdova-Izquierdo y su grupo de trabajo (2009), determinaron la seropositividad del VDVB y otros virus del complejo respiratorio bovino (CRB) en animales sin vacunar, en los trópicos húmedos de México y es cercana a 90% para VDVB. Por otro lado Segura-Correa y otros en el 2010, reportaron una incidencia de la seroconversión en el estado de Michoacán del 16.4%, en diferentes temporadas de muestreo, en hatos lecheros, donde no se practica la vacunación (Noviembre, 2000 a Septiembre, 2001 y Diciembre, 2001 a Noviembre, 2002) y una seroprevalencia del 63.2%, además mencionan que el impacto económico puede ascender de \$937 a \$1100 dólares por abortos.

El VDVB pertenece a la familia Flaviviridae, género pestivirus, está emparentado filogénicamente con los virus de la Fiebre porcina clásica (CSFV) y la enfermedad de las fronteras de los ovinos (BDV). Además es parte del complejo respiratorio bovino, conformado por: Herpes virus tipo I (BoHV1), Parainfluenza bovina tipo 3

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

(BPIV3) y Virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), que también son causantes de enfermedad respiratoria y abortos en bovinos (Meléndez *et al.*, 2010).

ii.ii Organización genómica

El VDVB está conformado por una cadena simple de RNA de sentido positivo con una longitud de 12.5 Kb, es un virus envuelto de forma esférica, mide de 40 a 60 nm de diámetro (Figura 1), se encuentra clasificado en el Grupo IV de Baltimore. Su genoma está constituido por un solo marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una poliproteína de alrededor de 4000 aminoácidos. Este marco está flanqueado por una región no traducida 5' (UTR 5') altamente conservada en todo el género pestivirus y por otra región no traducida 3' (UTR 3'). La región no traducida 5' contiene una estructura secundaria conocida como IRES, que actúa como un sitio de entrada e internalización al ribosoma (Quadros *et al.*, 2006) ver figura 2.

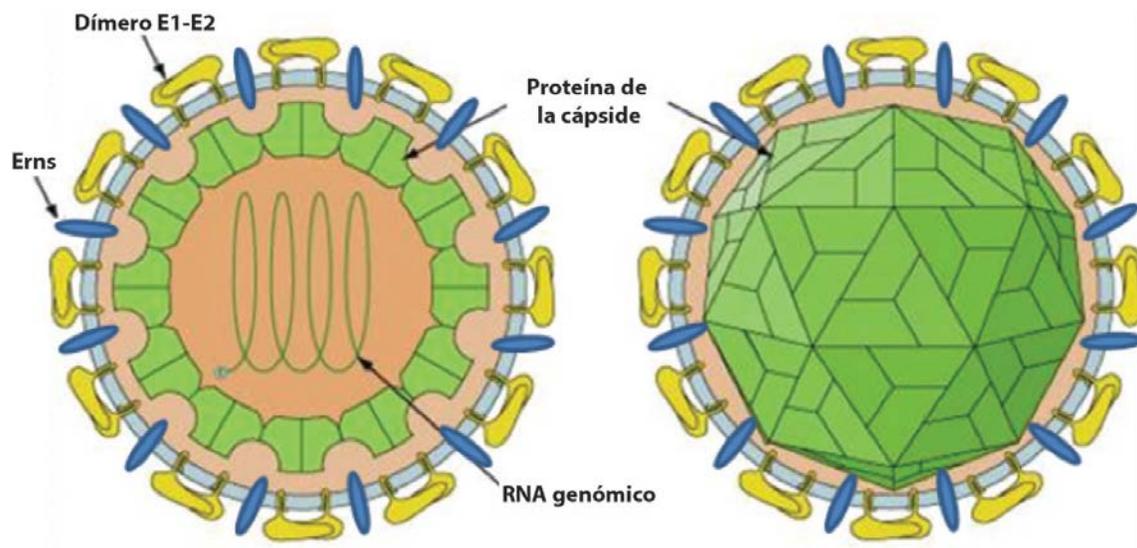


Figura 1. Representación esquemática del VDVB y morfología viral (Coetzer y Tustin, 2004, Vargas *et al.*, 2009)

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

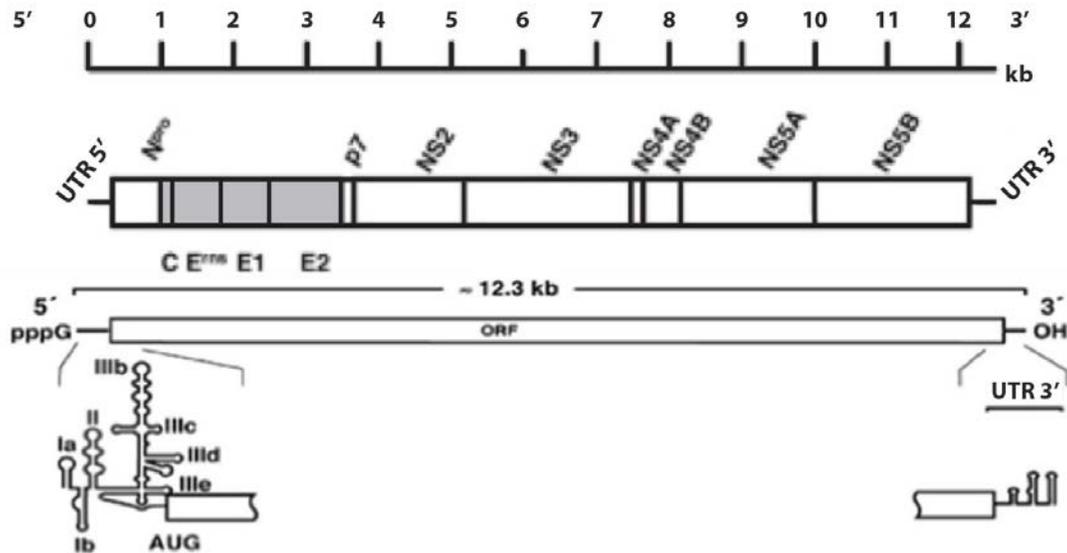


Figura 2. Organización genómica y longitud del VDVB (Collett *et al.*, 1988, Lindenbach *et al.*, 2007).

ii.iii Regiones no traducidas 5' y 3' (UTR 5' y 3')

Las regiones conservadas de las regiones UTR permiten el diseño de sistemas de detección de los pestivirus (Vilcek *et al.*, 1994), mientras que las regiones variables pueden servir como la base de la identificación de las especies en el género Pestivirus (Letellier y Kerkhofs, 2003). La UTR 5' ha sido utilizada ampliamente en estudios de evolución, epidemiología y taxonomía (Sarikaya *et al.*, 2012). La UTR 5' se encuentra conservada en un 70% en su secuencia de nucleótidos entre los pestivirus, 75% entre genotipos y 86 al 98% entre los subgenotipos (Chase *et al.*, 2005, Dong-Kun *et al.*, 2007 y El-Hafeiz *et al.*, 2009).

La UTR 5' del VDVB tiene una longitud aproximada de 383 a 385 nucleótidos. Se encuentra altamente conservada en su secuencia entre los diversos pestivirus, no obstante contiene tres regiones variables intercaladas (Bálint, 2005) y se les han

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

denominado: Tallo PV1, V1 o palíndromos específicos que abarcan del nucleótido (nt) 197 al 235, Tallo PV2 o V2 (nt 267-289) y Tallo PV3 o V3 (nt 293-311), en donde se han encontrado motivos de diferenciación entre las especies de la familia pestiviral, por la determinación de sustituciones nucleotídicas presentes en éstas regiones, mediante el análisis de la estructura primaria por secuenciación (Giangaspero *et al.*, 2008 y Sarikaya *et al.*, 2012), la construcción de árboles filogenéticos y la predicción de estructuras secundarias a través de modelaje computacional, utilizando herramientas de bioinformática en las que se puede además, inferir la virulencia de un virus por la conformación del IRES (Giangaspero *et al.*, 2008). La estructura secundaria de UTR 5', forma estructuras de tallo-bucle u horquillas que contienen cuatro dominios principales: A, B, C y D, que se encuentran subdivididos en los extremos de horquillas. De los que en el extremo denominado Ib, se encuentra el IRES (Giangaspero *et al.*, 2008).

Becher y colaboradores (2000) reportan que los 75 nucleótidos que preceden al IRES, forman dos horquillas que han resultado ser esenciales para el ciclo de replicación del virus, asociadas en la síntesis de RNA de cadena positiva (Turner *et al.*, 2004). Las mutaciones por sustituciones nucleotídicas, en estas horquillas dan como resultado un fenotipo de crecimiento restringido que puede formar placas más pequeñas y tienen menor tasa de crecimiento que el virus parental (Becher *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1999). La sustitución de nucleótidos en la región del IRES, podría ser responsable de la baja o alta virulencia, en la que se ve afectada la eficiencia de la traducción del RNA a proteína, teniendo virus con traducción baja y por lo tanto menos virulento o virus de traducción alta y más virulentos. Ésta relación la describe Giangaspero *et al.* (2008) por la identificación de una sustitución de dos nucleótidos en la posición 219 y 278, uracilo y citocina están presentes para una cepa Osloss “más virulenta” y citocina y uracilo respectivamente, para una cepa “menos virulenta”. Éste tipo de mutaciones se han denominado como sustituciones de nucleótido palindrómico (PNS, por sus siglas en inglés).

La observación de las variaciones de nucleótidos entre las cepas de virus a nivel de las tres regiones variables en la 5' UTR ha sido concebida como un método de genotipificación, implicando un análisis simple y práctico, mostrando resultados esencialmente cualitativos y proporcionando una clasificación exacta de la especie de un aislado, por lo tanto, éste método puede ayudar a establecer las especies y los límites entre genotipos (Giangaspero *et al.*, 2008).

Respecto a la UTR 3', ésta posee elementos estructurales en la secuencia del genoma viral que son considerados necesarios para la síntesis de la cadena negativa complementaria de RNA (Yu *et al.*, 2000). Tiene una longitud de 188 nucleótidos para el VDVB Osloss y aproximadamente 228 nucleótidos para otras cepas de VDVB (Collett *et al.*, 1988). Una región variable y una región conservada se identificaron en el UTR 3'. La parte 5' de la UTR 3' muestra notable heterogeneidad de tamaño y está implicada en la coordinación de la traducción y la replicación viral. En contraste, la parte 3' de ésta UTR comprende un número de motivos de RNA característicos que representan sitios bien definidos de interacción de las proteínas virales y celulares durante la replicación del RNA, además de encontrar nucleótidos conservados en todos los pestivirus (Yu *et al.*, 1999).

ii.iv Proteínas del virión

La poliproteína sintetizada es co y post-traduccionalmente procesada por proteasas virales y celulares originando de 11 a 12 proteínas estructurales y no estructurales, ver figura 3.

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

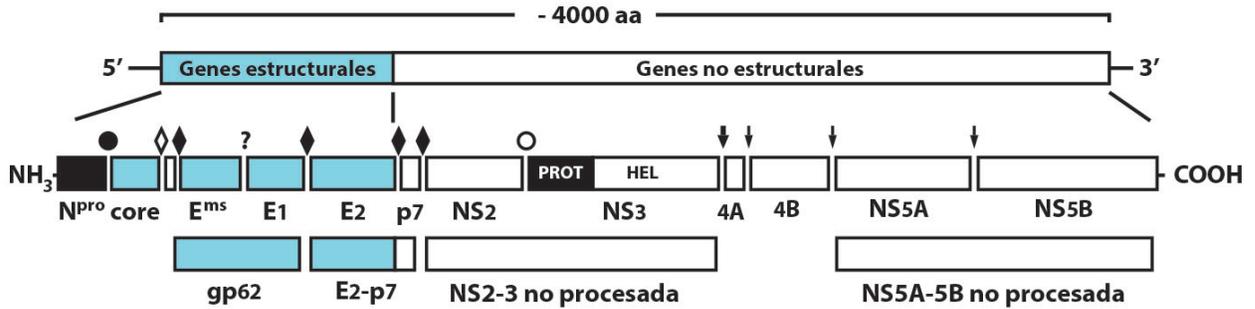


Figura 3. Representación esquemática del orden de las proteínas estructurales y no estructurales, así como los sitios de procesamiento de cada una de ellas para dar como resultado proteínas maduras (Lindenbach *et al.*, 2007)

ii.iv.i Npro

La primera proteína no estructural, encontrada únicamente en los pestivirus (Seago *et al.*, 2007), es una autoproteasa amino terminal (N-terminal) que como su nombre lo indica se autocataliza postraduccionalmente para liberarse de la proteína de la cápside, en el aminoácido Cys168 y Ser 169 de la poliproteína. Los aminoácidos esenciales para su actividad proteolítica son Cys 69, His 49, y Glu 22 (Wiskerchen *et al.*, 1991). Diversos estudios han sugerido que puede actuar como antagonista del interferón de tipo I (IFN I), y por lo tanto jugar un papel importante en el establecimiento de la infección persistente y la inmunotolerancia (Hilton *et al.*, 2006).

ii.iv.ii C o Core

La proteína denominada C o Core es la proteína de menor tamaño en el virión (14 KDa) y es procesada en su extremo N-terminal por la proteína Npro, antes de su ensamblaje en el virión (Riedel *et al.*, 2012). Murray y colaboradores en 2008, demostraron que C, es una proteína que tiene afinidad al RNA, con la capacidad de empaquetar el genoma viral. Bajo ciertas condiciones experimentales se ha observado, que C mantiene interacciones con las glicoproteínas, que son

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

necesarias para que el virión adquiriera su envoltura pero aún no se han dilucidado bien los mecanismos de la morfogénesis del virión (Collett *et al.*, 1988, a.Murray *et al.*, 2008).

ii.iv.iii Erns (E0)

La glicoproteína de la envoltura a la que se le ha atribuido una función de RNasa de ahí su nombre Erns (Ribonucleasa secretada) (Fetzer *et al.*, 2005); carece de un sitio típico de anclaje en la membrana y cumple con su asociación a la envoltura viral a través de su región C-terminal, formando una hélice anfipática que tiene la función de mediar su transporte hacia la membrana (Tews *et al.*, 2009). Erns es el primer contacto con la célula, a través de su extremo carboxilo terminal (COOH) ya que tiene afinidad con glicosaminoglicanos (Wegelt *et al.*, 2009). Se ha identificado una función como RNasa, cuando es secretada, de esta forma se cree que regula la síntesis de RNA en células infectadas (Lazar *et al.*, 2003, Kampa *et al.*, 2006), también se asocia a la inhibición de síntesis de proteínas para la proliferación celular de los linfocitos y se cree que induce apoptosis selectiva en linfocitos de varias especies animales por su acumulación en la membrana y consecuentemente este evento conduce a la inmunosupresión (Bruschke *et al.*, 1997, Meyer *et al.*, 2002). Esta proteína no tiene equivalente en otros flavivirus a diferencia de E1 y E2. Erns puede ser secretada en gran cantidad en el medio de las células infectadas, de igual forma es encontrada en suero de animales persistentemente infectados, lo que la hace un buen candidato para el diagnóstico y como potencial blanco para el desarrollo de vacunas (Kampa, 2006 y Wegelt *et al.*, 2009), además se han construido virus recombinantes, que han sido clínicamente atenuados mediante deleciones en el sitio de N-glicosilación, así como otras mutaciones en los que se ha truncado su actividad de RNasa (Burrack *et al.*, 2012).

ii.iv.iv E1

La proteína E1 es una glicoproteína que está conformada por dos dominios hidrofóbicos que le sirven de anclaje a la membrana (Weiland *et al.*, 1999). E1 forma heterodímeros con E2 que resultan ser esenciales para la entrada del virus a la célula hospedera (Ronecker *et al.*, 2008, Omari *et al.*, 2013).

El suero de animales convalecientes no contiene niveles significativos de anticuerpos neutralizantes contra E1 (Zarkov y Jarullah 2012). Esto indica que E1 tiende a acumularse en el retículo endoplásmico o en la zona cis del Aparato de Golgi (la zona más cercana al Retículo endoplásmico), por su asociación con la región transmembranal (Machamer *et al.*, 1990, Hulst *et al.*, 1993). La proteína E1 mantiene una función reguladora mediante la retención de sí misma, mediante su liberación en un punto tardío de la infección, por lo que E1 es el factor limitante para la generación de los heterodímeros E1-E2 (Wegelt *et al.*, 2009). E1 presenta regiones hipervariables, sin embargo la divergencia más significativa se ha observado predominante en la Glicoproteína E2 (Bassett *et al.*, 1999). E1 puede ser un excelente candidato para el desarrollo de vacunas seguras y efectivas, desarrolladas en sistemas de expresión (Hulst *et al.*, 1993, Beer *et al.*, 2007)

ii.iv.v E2

La glicoproteína E2 se encuentra en la envoltura del virión y juega un papel clave en la unión con los receptores de la superficie celular, se sabe que su principal ligando es el CD46 (CD46 Bov) que es un receptor celular que tiene función de cofactor para los factores serina-proteasa del plasma, que escinde las proteínas del complemento C3b y C4b. CD46 pertenece a la familia de reguladores de la activación del complemento que incluye otras proteínas de superficie celular, como CD35, CD21, y CD55 (Maurer *et al.*, 2004; Krey *et al.*, 2006) presente en diversos ungulados y expresado en células polimorfonucleares (PMN), como linfocitos, monocitos y macrófagos, así como células epiteliales y endoteliales (Donis *et al.*,

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

1991, Christmas *et al.*, 2006, Peternahns *et al.*, 2010). E2 también participa en la fusión de membrana, el ensamblaje del virus y maduración de los viriones. Durante el ensamblaje del virus se forman homodímeros E2 tempranos, mientras que los heterodímeros de E1-E2 se forman después de la liberación de E1 en el retículo endoplásmico (Omari *et al.*, 2013). E2 consiste de 370 aminoácidos, un ectodominio N-terminal y un C-terminal, en éste se encuentran 30 aminoácidos que funcionan como anclaje (Donofrio *et al.*, 2006). El dominio N-terminal es el más inmunogénico (Bolin *et al.*, 1998). Posee epítopes que pueden ser usados para estudiar la diversidad molecular y serológica de los virus de VDVB e induce la producción de anticuerpos neutralizantes (Van Rijn *et al.*, 1997, Donofrio *et al.*, 2006, Lindenbach *et al.*, 2007). Ésta proteína es genética y antigénicamente la más variable y altamente mutable y por tal motivo puede dar lugar a la aparición de nuevas cepas que facilitan el mantenimiento de la persistencia de la infección ya que da lugar a poblaciones heterogéneas de viriones, o quasiespecies, que contribuyen a la evasión la respuesta inmunológica (Bassett *et al.*, 1999; Lackner *et al.*, 2005).

ii.iv.vi P7

La proteína P7 es el enlace entre las proteínas estructurales y las no estructurales de los pestivirus y del virus de hepatitis C (HCV); aún no es claro si p7 es estructural o no estructural (Lindenbach *et al.*, 2007). Peculiarmente la región E2/P7/NS2 está muy conservada entre los pestivirus y HCV, lo que sugiere tener una función común sobre éstas proteínas, una de ellas está relacionada con la maduración de la glicoproteína E2 y la morfogénesis viral (Elbers *et al.*, 1996, Lindenbach *et al.*, 2007). Se han identificado que P7 posee un dominio citoplasmático que interactúa con la proteína de la cápside para iniciar el proceso de gemación (Harada *et al.*, 2000) y que la estructura de P7 es muy similar a una viroporina que ayuda a la permeabilización de la membrana y por consiguiente facilita la liberación de la

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

progenie viral (Harada *et al.*, 2000). Su procesamiento es mediado por peptidasas del hospedero, pero se ha reportado que puede ocurrir un procesamiento ineficiente, resultando en dos especies de E2, E2 y E2-P7 en las células infectadas (Harada *et al.*, 2000)

ii.iv.vii NS2/NS3

La proteína NS2 es una cisteína proteasa, que es responsable del procesamiento de NS2-3, ésta escisión es esencial para la replicación del RNA de los pestivirus y la eficiencia en la escisión está regulada por una chaperona celular que determinará la citopatogenicidad viral (Lackner *et al.*, 2006). El grado de procesamiento en el sitio de NS2-3 muestra una variación notable entre las especies y cepas de los pestivirus (Lindenbach *et al.*, 2007). En relación con la citopatogenicidad viral VDVB, se ha identificado que el biotipo no citopático (NCP) expresa NS2-3, mientras que el biotipo citopático (CP) expresa un nivel detectable de NS3, de éste modo se considera a NS3 como la proteína marcadora de citopatogenicidad (Bálint, 2005).

En conjunto se ha identificado que NS2-3 participa en el ensamblaje del virus (Agapov *et al.*, 2004). NS3 es la proteína más conservada en los pestivirus e induce un alto título de anticuerpos neutralizantes después de la infección natural o vacunación, con vacunas vivas atenuadas (Donis *et al.*, 1988; Bolin y Ridpath, 1998). Por otro lado la proteína NS3 posee un dominio N-terminal que funciona como serina proteasa, responsable del procesamiento de la poliproteína y la supresión de la replicación del RNA, requiere la actividad de NS4A como su cofactor (Bálint, 2005). También posee un dominio C-terminal que funciona como RNA helicasa, además se ha identificado que tiene otra actividad enzimática como ATPasa, siendo éstas dos últimas funciones importantes en la replicación del RNA (Borowski *et al.*, 2002, Kabongo, 2005, Lindenbach *et al.*, 2007).

ii.iv.viii NS4A y NS4B

NS4A es un cofactor para la actividad proteolítica de NS3 (Tautz *et al.*, 2000), y se requiere para la escisión en sitios NS4B/NS5A y NS5A/NS5B (Xu *et al.*, 1997).

NS4B es una proteína transmembranal, posee un dominio de membrana citoplasmático que puede interactuar con las proteínas virales, como con NS3 y con factores celulares que están involucrados en la replicación viral, NS4B ha sido relacionado en el cambio de un virus citopático (CP) a un no citopático (NCP), sugiriendo que tiene un papel en la patogénesis viral, también está relacionada en la replicación del genoma de VDVB ya que interactúa con NS3 y NS5A, lo que propone que es parte del complejo de replicación (Qu *et al.*, 2001). Las mutaciones en esta proteína pueden suprimir el efecto citopático, con independencia de la producción y acumulación de NS3 (Bálint, 2005).

ii.iv.ix NS5A y NS5B

NS5A es una proteína no estructural involucrada en el reclutamiento de componentes esenciales en la replicación viral, ha sido descrita su interacción con el factor-1 traduccional de elongamiento (eEF1A) por Johnson y colaboradores (2001), lo que sugiere un papel durante la replicación del RNA. NS5B ha sido identificada como una polimerasa dependiente de RNA (b Collett *et al.*, 1988; Zhong *et al.*, 1998) que puede replicar RNA por ambas vías: cebador-dependiente (Elongativa), en donde la síntesis es iniciada por un oligonucleótido o una proteína unida covalentemente a nucleótidos y la cebador-independiente (*de novo*) en donde el cebador es un nucleótido específico de la cadena molde (Lai *et al.* 1999; Ranjith-Kumar *et al.*, 2002, Ansari *et al.*, 2004).

Las proteínas no estructurales recién sintetizadas, se cree que se ensamblan en complejos funcionales de replicación y llevan a cabo el primer paso de la replicación del genoma, de cadena negativa (antigenoma) o síntesis de RNA viral.

Posteriormente la polimerasa completa la síntesis de progenie de RNA de cadena positiva utilizando como templado la cadena negativa (Johnson *et al.*, 2001)

ii.v Replicación viral

El virus de la diarrea viral bovina ingresa a la célula por endocitosis mediada por receptores, dependiente de clatrina y pH ácido (ver Figura 4), para liberar su genoma en el citosol (Mathapati *et al.*, 2010). La mayor interacción de anclaje del virus con la célula se encuentra orquestada por la glicoproteína E2 que se une al receptor CD46 de la superficie celular (Krey *et al.*, 2006), siendo éste un receptor de complemento, expresado en las células linfoides como, monocitos, macrófagos, células dendríticas, epiteliales y endoteliales (Cattaneo, 2004), además es capaz de unirse a moléculas de actina. Erns tiene la primera interacción con la superficie celular, por su unión con los glicosaminoglicanos de heparan sulfato. Se ha reportado por diversos autores como Agnello y colaboradores (1999) que el VDVB es capaz de unirse con los receptores lipoproteícos de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés) en células de cerdo (Ammari *et al.*, 2012). Proteínas adaptadoras se unen a la clatrina y la concentración local de estas proteínas en la cara interna de la membrana plasmática, permite multimerizar a la clatrina para formar invaginaciones características (Clathrin Coated Pit, CCP). La escisión de las proteínas de membrana DNM1/Dynamin-1, DNM2/Dynamin-2 pinchadoras, liberan vesículas revestidas de clatrina (CCV), que posteriormente serán liberadas por la Auxilina y Hsc70 (Heat shock cognate protein 70), entran en contacto con el endosoma y vacían su contenido (Parent *et al.*, 2009). El pH endosomal ácido y la unión al receptor generalmente induce modificaciones estructurales de las proteínas de superficie del virus que conduce a la penetración del genoma en el citoplasma a través de mecanismos de fusión o permeabilización

Después de su anclaje con la célula y ser endocitado, la replicación continúa con el complejo de ribonucleoproteínas en el citosol de la célula. Éste complejo comienza a tener interacción con los ribosomas, pero las señales que dirigen el

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

tráfico intracelular no se conocen del todo (Bálint, 2005). La traducción del genoma viral requiere al menos de la liberación parcial de la proteína de la cápside del RNA viral. El RNA genómico funciona como RNA mensajero (RNAm), la traducción y el procesamiento de la poliproteína tienen lugar principalmente en el retículo endoplásmico (RE) (Johnson *et al.*, 2001).

A partir de la región N-terminal de la poliproteína, se da el primer procesamiento, entre Npro y la Cápside (Stark *et al.*, 1993), las divisiones adicionales generadoras de las proteínas estructurales se catalizan por peptidasas celulares (signalasas) en el Retículo endoplásmico (RE) o en el aparato de Golgi (Rümenapf *et al.*, 1993), en donde se da el ensamblaje de los viriones y adquieren su envoltura lipídica; las divisiones restantes que generan las proteínas no estructurales (NS) son catalizadas por la serina proteasa que reside en NS2-3 utilizando a NS4A como cofactor (Xu *et al.*, 1997).

Las proteínas NS nacientes y componentes celulares se asocian con el extremo 3' del RNA genómico para formar los complejos de replicación. El primer paso de la replicación del RNA viral se inicia mediante la síntesis de una de cadena negativa de RNA complementario, a la genómica de cadena positiva (Behrens *et al.*, 1998). El ensamblaje tiene lugar en el RE o en el aparato de Golgi (Bielefeldt- Ohmann *et al.*, 1987). Se produce liberación de los viriones por gemación a través de las membranas intracelulares en vesículas citoplasmáticas que utilizan los complejos de ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) en el retículo endoplásmico, se transportan al aparato de Golgi y en seguida salen de la célula a través de la vía secretora (Exocitosis). La proteína p7 es esencial para el ensamblaje final de los viriones, funcionando como una viroporina que se inserta y desestabiliza la membrana, facilitando la liberación de los virus a través de la membrana plasmática. Cada célula infectada libera 100-1000 viriones infecciosos por ciclo de replicación (Harada *et al.*, 2000). VDVB se replica de manera eficiente en células epiteliales y polimorfonucleares del orden *artiodactyla*. La replicación es óptima en células bovinas, ovinas y caprinas, mientras que la replicación es menos eficiente en las células porcinas (Bolin *et al.*, 1994).

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

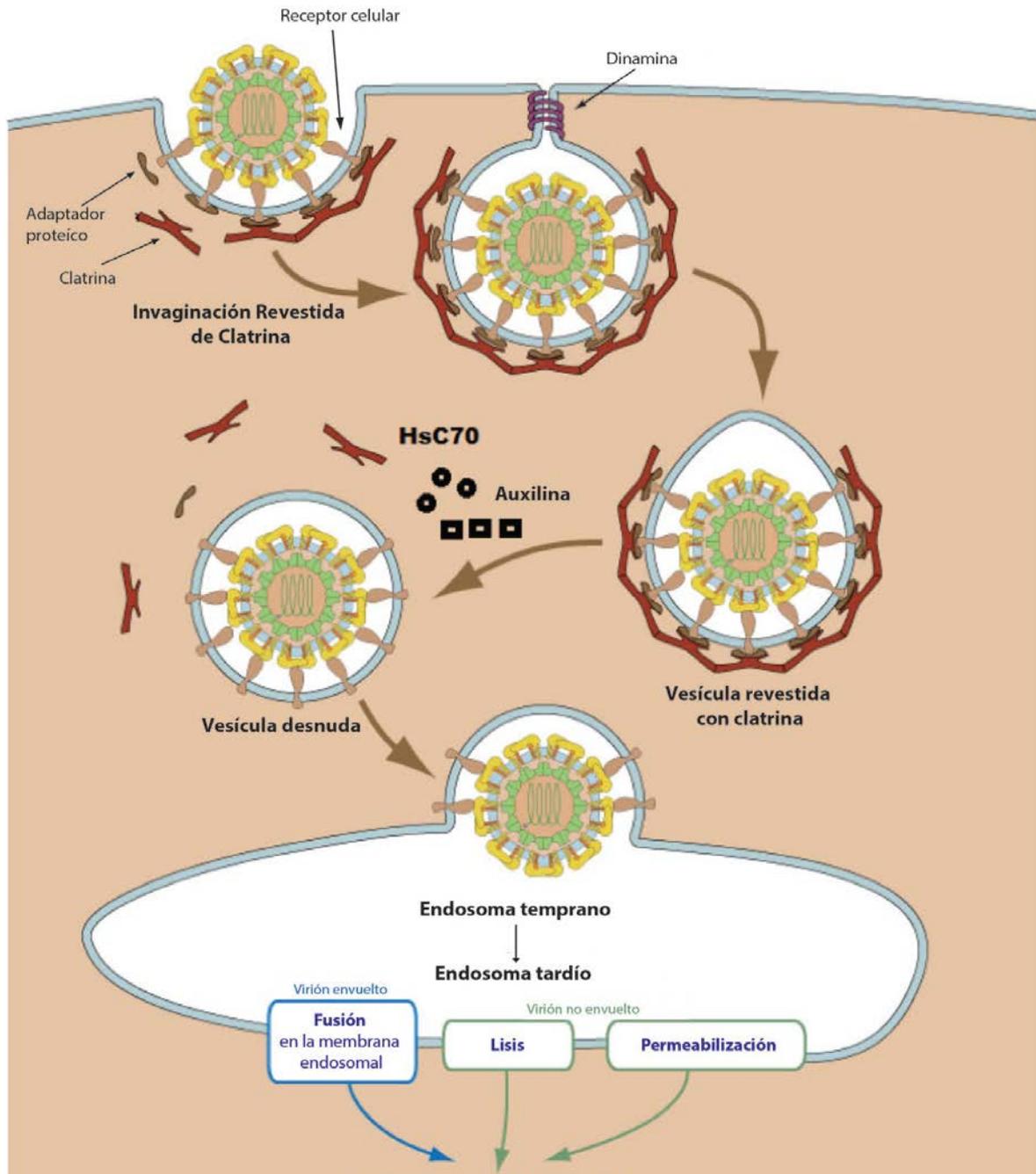


Figura 4. Entrada mediada por endocitosis vía clatrina (CME) se activa por la unión del virión a receptores. Proteínas adaptadoras se unen a la clatrina y la concentración local de éstas proteínas en la cara interna de la membrana plasmática, permite multimerizar a la clatrina para formar invaginaciones características (Clathrin-coated pit/CCP). Escisión de las proteínas de membrana DNM1/Dynamín-1, DNM2/Dynamín-2 pinchadoras, que liberan vesículas revestidas de clatrina (CCV), que posteriormente serán liberadas por Auxilina y Hsc70. Entra en contacto con el endosoma y vacía su contenido. El pH endosomal ácido y la unión al receptor generalmente induce modificaciones estructurales de las proteínas de superficie del virus que conduce a la penetración del genoma en el citoplasma a través de mecanismos de fusión o permeabilización (Modificado de expasy.org/viralzone).

ii.vi Genotipos y Biotipos

Los avances en secuenciación genética a finales de los ochenta permitieron establecer dos genotipos de VDVB: el 1 y 2, caracterizados por diferencias en las zonas 5' UTR y los genes que codifican para las proteínas Npro y E2. Estos análisis permiten tanto la clasificación en las cuatro especies pestivirales: Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) que se divide en 2 especies, Fiebre Porcina Clásica (CSFV), Virus de la enfermedad de las fronteras del ovino (BDV). Actualmente, el grupo de Schirrmeyer y colaboradores (2004) han propuesto una quinta especie por, pestivirus atípicos, representada por virus aislados en jirafa que difiere significativamente en genoma y propiedades antigénicas (Peterhans *et al.*, 2010). La clasificación genotípica está basada en la divergencia de las secuencias genómicas virales, reveladas por los análisis filogenéticos. A medida que crecen las bases de datos de secuencias de pestivirus y se van incluyendo en los análisis filogenéticos, se van formando más grupos dentro de cada especie (Ridpath y Bolin, 1998 y Vilcek *et al.*, 2001).

El porcentaje de divergencia en secuencias completas de nucleótidos para diferentes especies es de 29- 45.5% y para subgenotipos de 16.3- 25.4% dentro una especie (Ávalos *et al.*, 2001). Cuando se evalúan segmentos parciales, en el caso de E2 se describen porcentajes de divergencia de 41.4- 67.8% entre especies, 17.4- 40.8% entre subgenotipos y porcentajes menores que 18.8% entre aislados dentro de un mismo subgenotipo (Becher *et al.*, 1999). La divergencia reportada para Npro se considera entre 36.2- 55.9% para diferentes especies dentro del mismo género y de 16.2- 28.8% entre subgenotipos de la misma especie. Para los estudios realizados para la región 5' UTR, describen porcentajes de divergencia del 7.4- 23.4% para diferentes genotipos y menores a 14.8% para subgenotipos (Becher *et al.*, 1999). El análisis filogenético determina la clara formación de grupos y subgrupos genéticos dentro de la especie (Vilcek *et al.*, 2001). En la literatura se han establecidos 11 subgenotipos de VDVB tipo 1 (a-l) y 2 subgenotipos del VDVB- 2 (a y b) (Peterhans *et al.*, 2010, Decaro *et al.*, Xia *et*

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

al., 2011). Esta diversidad genética del VDVB está asociada con la propensión de los virus RNA a modificaciones genómicas como mutaciones y recombinaciones (Peterhans *et al.*, 2010). Estudios genéticos del VDVB, sugieren que el genotipo 2 fue originado a través de la acumulación de dichas mutaciones; este genotipo es prevalente en Estados Unidos de América y Canadá, y se ha relacionado con signología hemorrágica y alta mortalidad, causando una infección aguda severa, muy similar a la enfermedad de las mucosas (Ridpath *et al.*, 2006).

El análisis de la región UTR 5' ha mostrado ser un método diagnóstico más confiable y reproducible para la caracterización de aislados de VDVB y para poder identificar subgenotipos virales predominantes en una zona determinada (Fulton *et al.*, 2005), así mismo se han considerado otras regiones variables del genoma de los VDVB como Npro, Erns, E1-E2 para, de este modo dirigir estrategias de control como la aplicación de vacunas contra un determinado subgenotipo (Ståhl y Alenius, 2012).

Por otro lado, las diferencias antigénicas de los virus de VDVB están relacionadas con las diferencias genéticas (Fulton *et al.*, 2005), basadas en diversos estudios serológicos como los realizados por Botton y su grupo de investigación (1998), ellos observaron que la similitud antigénica entre los virus es alrededor de 74.24%, dado por un valor de porcentaje de neutralización homóloga, que establecieron por medio de ensayos de neutralización cruzada, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales (mAbs), comparando diferentes virus aislados de campo y se concluyó que no era posible definir serotipos. Previo a Botton y su equipo de trabajo (1998), se realizó un análisis antigénico comparativo con un panel amplio de mAbs por Donis y colaboradores en el año de 1991 y reveló que existe una gran heterogeneidad antigénica entre virus aislados de campo. Behera y colaboradores en 2010 realizaron pruebas de neutralización cruzada utilizando antiseros contra cepas de VDVB procedentes de India, que circulan en diferentes especies de rumiantes (vacas, ovejas, cabras y yaks) y muestran diferencias antigénicas significativas sólo entre cepas de VDVB 1 y VDVB 2.

Por otro lado en Norteamérica, Pogranichniy y otros investigadores (2011) mencionaron que la mayoría de las vacunas disponibles en Indiana, incluyen sólo

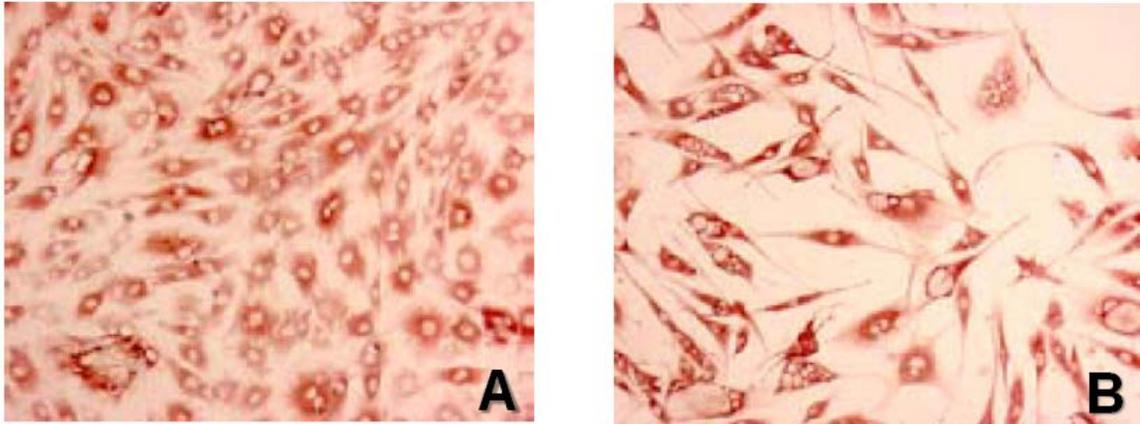
Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

VDVB 1a o VDVB 1a y VDVB 2a, y no VDVB 1b que es el más comúnmente aislado en los Estados Unidos de América las pruebas muestran que se inducen bajos títulos de anticuerpos de 1b, en comparación con los títulos de anticuerpos del 1a y por lo tanto la protección no es la adecuada, además de que no se sabe en qué medida existe la reactividad cruzada entre subgenotipos, dificultando el diagnóstico y las estrategias de inmunización (Botton *et al.*, 1998, Ridpath *et al.*, 2010). Los estudios han mostrado diferencias antigénicas entre los subgenotipos como lo demuestran las diferencias observadas en pruebas de neutralización cruzada (Botton *et al.*, 1998), unión de anticuerpos monoclonales (Donis *et al.*, 1991) y la respuesta de animales a vacunación heteróloga (Pogranichniy *et al.*, 2011). En éste contexto no se sabe, si las variaciones de los subgenotipos son suficientemente significativas como para tener un impacto en la detección o la protección por vacunación y sugiere que la protección de las vacunas se puede mejorar en base a la utilización de las cepas prevalentes de VDVB en las vacunas elaboradas para una región determinada (Ridpath, 2010). El VDVB, presenta dos biotipos diferenciados por sus efectos en cultivo celular: biotipo citopáticos (CP) y biotipo no citopáticos (NCP), el biotipo CP, causa vacuolización y muerte celular *in vitro* (Ridpath *et al.*, 2001, Rondón, 2006), ver figura 5. El virus predominante *in vivo* e invariablemente presente en animales persistentemente infectados (PI), es el NCP. Aunque ambos biotipos están presentes en el ganado, las cepas de VDVB pueden existir como uno de los dos biotipos, citopático y no citopático y una de sus presentaciones letales, en los CP es la conocida como “enfermedad de las mucosas” que será desarrollada en animales persistentemente infectados, al adquirir una superinfección por un virus homólogo CP (Lambot *et al.*, 1997, Chul *et al.*, 2005).

Los virus citopáticos son poco frecuentes y generalmente se encuentran en asociación con brotes de la enfermedad de las mucosas. Se cree que las cepas citopáticas surgen a partir de cepas no citopáticas, a través de eventos mutacionales que resultan en la escisión de la proteína viral NS2/3 en las proteínas NS2 y NS3.

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

Los virus NCP son caracterizados por la síntesis de la proteína NS2-3 (p125) y los citopáticos por expresar la proteína NS3 libre. (Vilcek *et al.*, 2000), Figura 6.



Rondón, 2006

Figura 5. Microfotografía de Células MDBK infectadas por ambos biotipos del Virus de Diarrea Viral Bovina A. Virus no citopático y B. Virus citopático (Rondón, 2006)

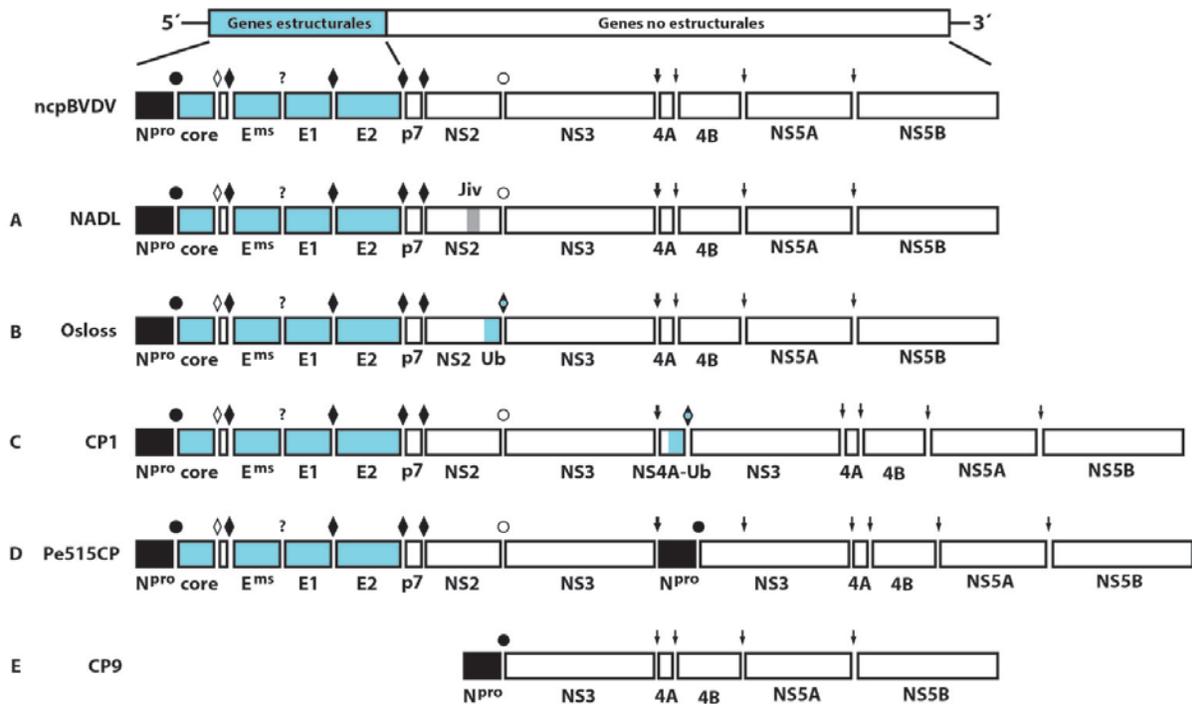


Figura 5. Rearreglos del genoma asociados con la generación de virus CP. El inciso A, Indica un virus NCP típico y del inciso B al E, los 5 diferentes aislados generados por recombinación de RNA (Lindenbach *et al.* 2007). NADL, Osloss, and CP1 se han encontrado inserciones celulares dando como resultado el procesamiento de NS3. En el caso de Pe515CP and the CP9 DI RNA, Npro (caja negra) fue mediador del procesamiento de NS3.

ii.vii VDVB y sus efectos en el sistema inmune

El virus de la diarrea viral bovina tiene tropismo por macrófagos, monocitos, células epiteliales, linfocitos T y B y células germinales. Tiene un efecto inmunosupresor que afecta principalmente la actividad de los linfocitos y otras células presentadoras de antígenos, por mecanismos de evasión de la respuesta inmune hacia la célula hospedera y un ejemplo claro de ello es el establecimiento de la persistencia viral (Brackenbury *et al.*, 2003). En una infección natural la presentación del antígeno se ve reducida, del mismo modo las moléculas co-estimuladoras, así como el número de linfocitos T como consecuencia de la inducción de la apoptosis en ellos, otros efectos en el sistema inmune dependerán de la cepa viral que éste causando la infección (Chase, 2013). Al respecto se ha estudiado *in vitro*, que los virus NCP estimulan la producción de citocinas y sustancias proinflamatorias de macrófagos sin embargo el efecto de la infección del VDVB *in vivo* en los macrófagos y otras células polimorfonucleares, no es claro (Peterhans *et al.*, 2003).

Se ha descrito que el CD14, se ve disminuido en una infección viral. CD14 es un receptor multifuncional constitutivamente expresado en la superficie de los monocitos, macrófagos y neutrófilos. Tiene un papel clave en la respuesta de defensa del hospedero frente a patógenos microbianos, tiene especificidad para lipopolisacáridos (LPS) y otros componentes derivados de la pared bacteriana (Elsheikh, 2004).

Un aspecto importante de la infección por VDVB es la inmunosupresión que aumenta la susceptibilidad del hospedero a infecciones virales o bacterianas secundarias. La expresión del receptor de Fc (FcR) y del receptor de complemento (C3R), la fagocitosis, la actividad microbicida y la producción de factores quimiotácticos se reducen de manera significativa en los macrófagos y neutrófilos recuperados de bovinos infectados con VDVB. Los macrófagos expuestos al virus *in vitro* reducen la expresión de FcR y C3R y su actividad fagocítica (Welsh *et al.*, 1995). *In vitro* cepas NCP inducen la generación de óxido nítrico (NO) y regulan la

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

producción de factor de necrosis tumoral en los macrófagos (Adler *et al.*, 1997, Glew *et al.*, 2003, Elsheikh, 2004). Para continuar en los esfuerzos para evaluar el efecto de la infección por VDVB en los parámetros inmunológicos *in vitro*, se estudió el efecto de VDVB en las funciones de los macrófagos alveolares bovinos (MΦ), ver tabla 1.

Efectos *in vitro* por la infección de VDVB sobre las funciones celulares en Macrófagos bovinos (MΦ)

Efecto	NCP	CP	
Síntesis de IFN de tipo I	=	↑	=: No efecto (Comparado con el control)
Inducción de apoptosis	=	↑	
Síntesis de Prostaglandina E ₂	=	↑	
Síntesis de NO después de tratamiento por LPS o S. dublin	↑↑	↓	↑↑ : Incrementado
Síntesis de TNFα después del tratamiento por LPS	↓↓	↓	↓↓ : Disminuido
Producción de Superóxido inducido por PMA	↓	↓	
Actividad procoagulante inducida por S. dublin	=	=	
Actividad inhibitoria de IL-1 inducida por LPS	↑	↑	
Citocinas inducidas por quimiotaxis	↓	↓	

Tabla 1. Funciones que se han alterado de manera similar por virus CP, así como con NCP mientras que otros fueron influenciados en una forma específica dependiendo del biotipo (Adler *et al.*, 1996; Peterhans *et al.*, 2003)

El virus modula mediante sus proteínas no estructurales, el nivel de sustancias proinflamatorias como el Leucotrieno B4 (LTB4), la Prostaglandina E2 (PGE2), la migración aleatoria de Neutrófilos, disminución de la secreción de inmunoglobulina en la circulación, disminución de la expresión de complemento y los receptores Fc, disminución de la quimiotaxis, la inhibición de la formación de leucotrienos y el IFN-α/β, además de la supresión de algunos genes que regulan el sistema inmune con respuesta antiviral como los ISGs (interferon-stimulated genes) (Glew *et al.*, 2003; Weiner *et al.*, 2012).

Se ha sugerido por diversos estudios que la proteína Npro interfiere con la respuesta primaria celular, funcionando ésta como un antagonista de interferón (IFN- α/β), estableciendo la infección persistente y la inmunotolerancia. En un animal infectado persistentemente se puede desarrollar una variante CP del virus o bien puede ser superinfectado con un virus homólogo CP (Smirnova *et al.*, 2008; Larsson, 2010).

La proteína Npro ejerce su actividad de proteasa en células infectadas y tiene como blanco al factor IRF3, que es un factor de transcripción clave involucrado con la respuesta antiviral que se expresa de manera constitutiva en el citoplasma y es activado por el reconocimiento de RNA de cadena simple por el receptor citoplásmico RIG1 (Retinoic acid-induced gene 1), activando la función de MAVS (Mitochondrial antiviral signaling protein) que es una proteína adaptadora mitocondrial, que tiene la función de desencadenar la producción de interferones.

El IRF3 activado migra al núcleo, donde se forma un complejo con el co-activador de transcripción CBP/p300, que conduce a la activación transcripcional del IFN- α y los genes de IFN- β (Figura 7), Npro lo ubiquitina dirigiéndolo a su degradación por el proteasoma y de éste modo afecta la síntesis de IFN (Hilton, 2006; Seago *et al.*, 2007).

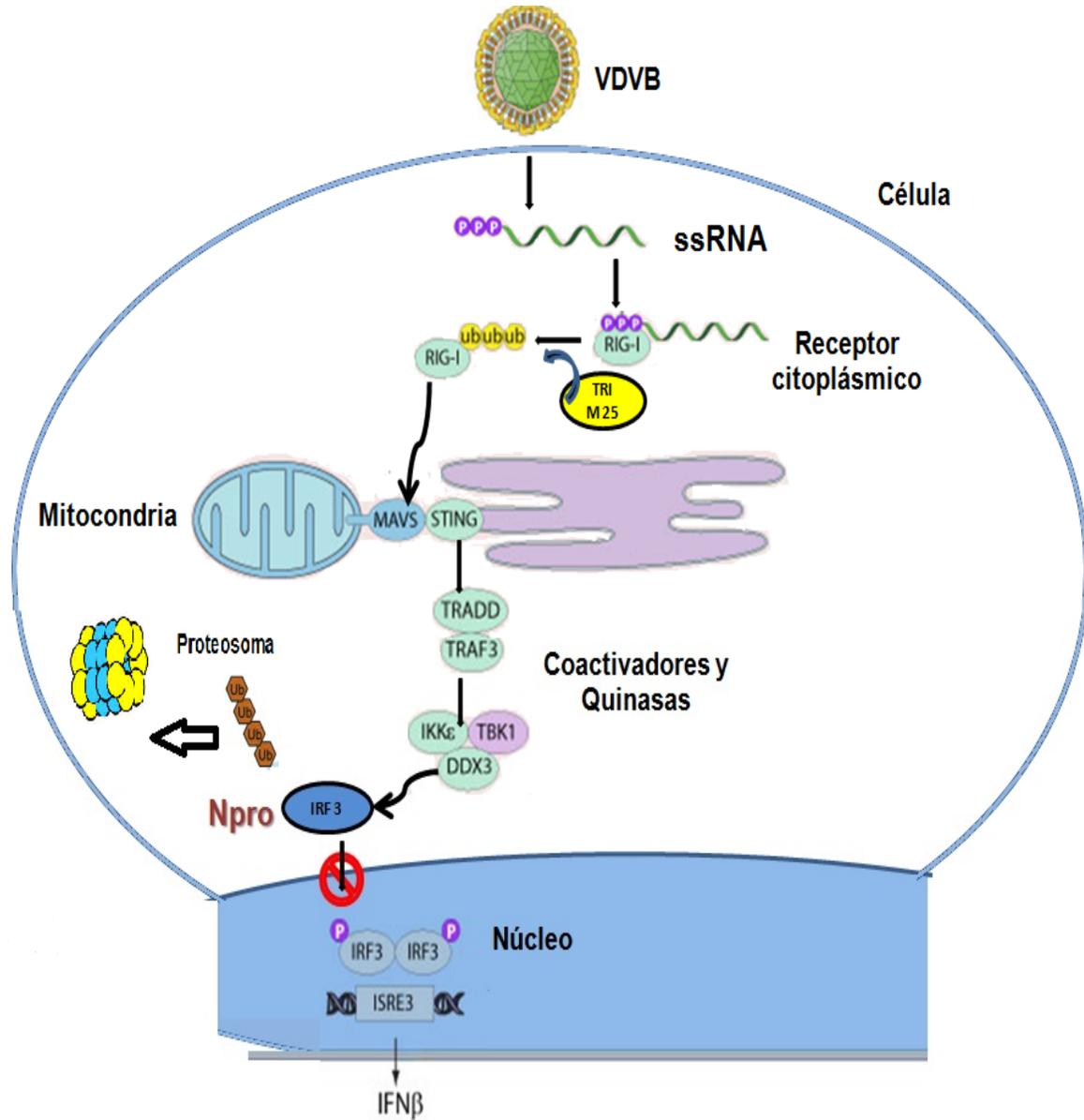


Figura 6. Debido a su papel crucial en la respuesta innata, IRF3 es el objetivo de muchas proteínas virales. Algunas proteínas virales interactúan con IRF3 y evitan su fosforilación, mientras que en otros casos como VDVB el IRF3 es dirigido al proteosoma para su degradación (Chen *et al.*, 2007; expasy.org/viralzone)

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

La infección durante el desarrollo fetal se produce en la ausencia de una respuesta funcional, de tal modo que el virus se establece como una infección persistente, por un virus NCP que tiene la capacidad de evitar la inducción de interferón (IFN) y un mecanismo para llevar a cabo éste bloqueo es por medio de la acción de la Erns secretada que se une a RNA de doble cadena (dsRNA) y degradarlo, para evitar ser detectado por los TLRs (TLR7/8) de la respuesta innata, de ése modo regula su replicación y también afecta la síntesis del IFN (La Rocca *et al.*, 2005), ver figura 8.

La infección fetal se establece en etapas tempranas de la gestación, mediante mecanismos que no están completamente dilucidados, sin embargo se sabe que se establece antes del desarrollo del sistema inmune competente, dando como consecuencia animales persistentemente infectados (PI), con viremia y susceptibilidad a infecciones secundarias y superinfecciones por virus homólogos (Webb, 2012).

El desarrollo de la infección persistente es una estrategia utilizada por éstos virus para evadir la respuesta inmune del hospedero, y el establecimiento de un reservorio de la infección en una población (Sminorva *et al.*, 2008)

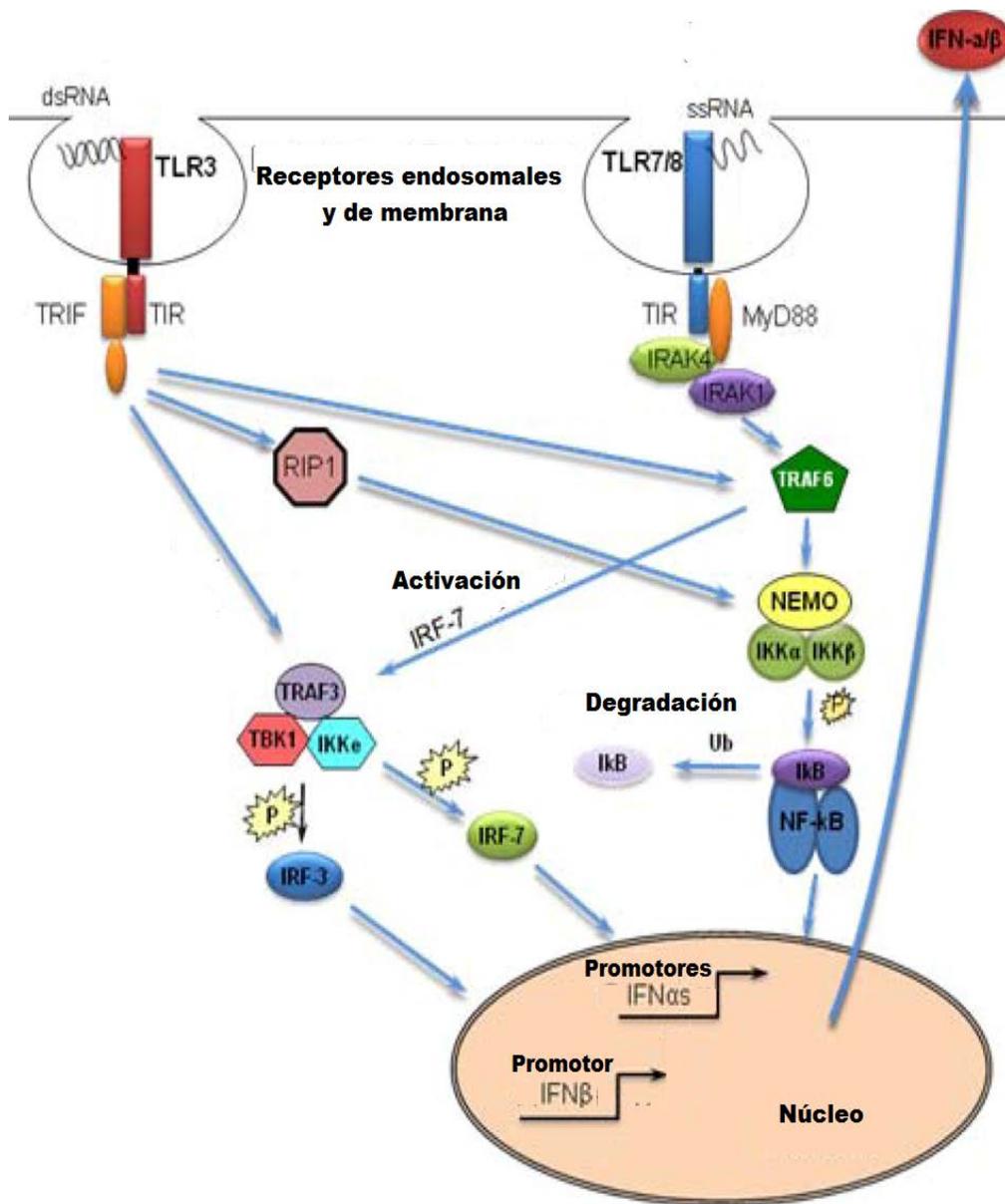


Figura 7. Receptores Toll like y la activación del IFN, en respuesta de infección por virus de RNA (Larsson, 2010)

ii.viii Epidemiología y signos clínicos de la enfermedad

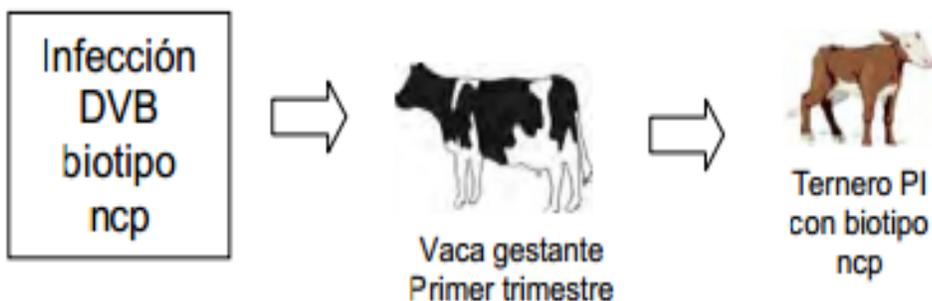
El virus de la Diarrea viral bovina es transmitido de manera horizontal de un animal susceptible a otro, por secreciones vía oral y nasofaríngea, o iatrogénica (por palpación rectal, inyecciones con agujas y vacunas contaminadas). Los signos clínicos varían de asintomáticos, signos transitorios leves a enfermedad aguda grave con signos entéricos, hematopoyéticos, trombocitopenia y hemorragia, problemas en el aparato reproductivo o respiratorio, hasta una forma clínica muy grave llamada síndrome hemorrágico o enfermedad de las mucosas (MD), que fue descrito por primera vez durante la década de 1990 asociada con virus de diarrea viral del tipo 2 (Chul *et al.*, 2005). Este síndrome se caracteriza por fiebre, neumonía, diarrea y muerte. El virus puede causar enfermedad severa con una alta mortalidad en todos los grupos de edad (Tautz *et al.*, 1998).

Por otro lado también se puede transmitir de manera vertical de la madre al feto, en el primer tercio de la gestación, dando como resultado a un becerro PI. De éste modo se tienen definidos 3 síndromes que causa el virus de la diarrea viral bovina que dependen de diversos factores como lo son la cepa viral, el hospedero y las condiciones medioambientales: Diarrea viral bovina (o infección postnatal primaria), infección fetal o *in utero* y la enfermedad de las mucosas (Potgieter, 1988), ver figura 9.

Primer Síndrome: Infección posnatal



Segundo Síndrome: Persistentemente infectados



Tercer Síndrome: Enfermedad de las mucosas

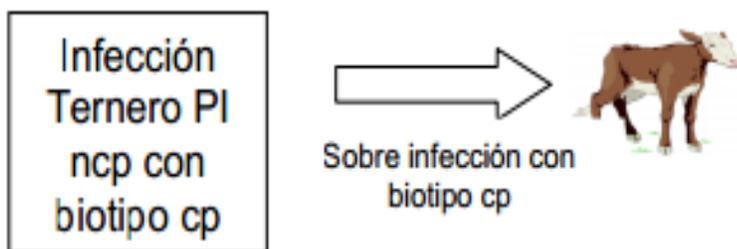


Figura 8. Diferentes síndromes ocasionados por la infección con VDVB. La infección posnatal es la forma clásica de la enfermedad, la cual resulta en infección subclínica o enfermedad severa. El desarrollo de la infección persistente se debe a la exposición al virus en el primer tercio de la gestación (Potgieter, 1988).

La infección fetal con VDVB puede tener diferentes consecuencias dependientes del momento de la exposición al virus durante la gestación y están asociadas con la diseminación transplacentaria del virus. Durante la viremia el virus invade los placentomas, se replica en el trofoblasto y cruza la placenta para llegar al feto. El VDVB, de 0 a 45 días puede ocasionar: Muerte embrionaria; de 45 a 175 días: Aborto, inmunotolerancia y defectos congénitos; de 125 a 285 días: Abortos, nacimiento de terneros débiles, aunque también pueden nacer terneros normales con anticuerpos neutralizantes pre-calostrales para VDVB (Grooms, 2004), ver figura 10. El antígeno viral ante la infección de hembras gestantes se ha detectado en el útero, placentomas, membranas y órganos fetales (Fredriksen *et al.*, 1999).

El VDVB presenta alto tropismo hacia células germinales de ambos sexos. La contaminación del semen con éste virus obedece a que éste se replica en la vesícula seminal y la glándula prostática, por lo tanto, el semen infectado se ve alterado en su calidad, observándose disminución de la motilidad espermática y aumento en el porcentaje de anomalías morfológicas de los espermatozoides (Da Silva *et al.*, 1995). El empleo de toros infectados de forma aguda o persistentemente infectados para la monta natural o fertilización es un factor para la diseminación de la infección.

En otras especies susceptibles como ovinos y caprinos, el VDVB, daña el endotelio vascular materno en los primeros 10 días de la infección y los residuos celulares resultantes son ingeridos por el trofoblasto fetal, puede causar de una moderada a severa, placentitis y a menudo necrotizante (Webb, 2012).

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

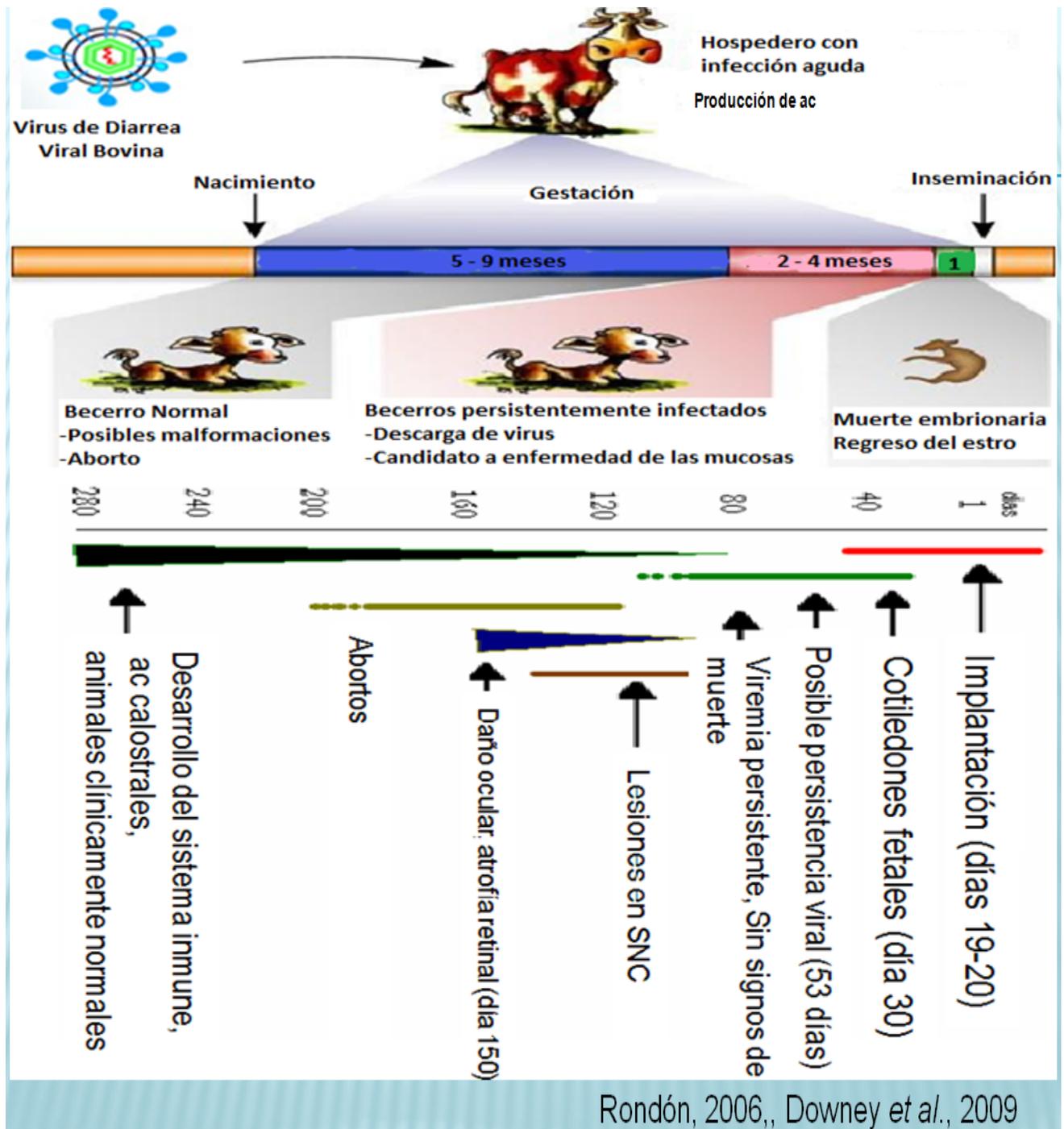


Figura 9. Posibles eventos producidos por la infección de diarrea viral bovina, durante la gestación bovina (Modificado de Rondón, 2006 y Downey *et al.*, 2009)

ii.ix Diagnóstico

Dentro de los métodos diagnósticos se tienen disponibles una gran diversidad de ellos y son herramientas para establecer las diferencias antigénicas y bien diferenciar las especies pestivirales, sin embargo el análisis de las secuencias de nucleótidos es el criterio más fiable.

ii.ix.i Aislamiento viral

La técnica de aislamiento viral fue desarrollada en el siglo pasado, cuando se logró la propagación *in vitro* de células humanas, como una alternativa del uso de embriones de pollo y el uso de animales de laboratorio para el aislamiento viral, desarrollando así los cultivos celulares. Los cultivos celulares derivan de células tomadas de un tejido y disgregadas por vías enzimáticas y mecánicas, proveyendo de un gran número de células para dicho fin, manteniendo su inocuidad de la contaminación por otros microorganismos, por el uso de antibióticos y equipo que mantiene una atmósfera de “aire limpio” (Hsiung, 1984, Leland y Ginocchio, 2007).

Es una técnica considerada como el “estándar de oro”, por evidenciar al virus como agente causal. El virus de la diarrea viral crece rápidamente en diversas líneas celulares y ha sido uno de los métodos diagnósticos más utilizados, sin embargo tiene un alto costo, su ejecución es laboriosa y se pueden presentar dificultades en el aislamiento de cepas de campo, debido a que pueden existir líneas celulares persistentemente infectadas con VDVB (Sandvik, 1999, Uryvaev *et al.*, 2012) o sueros fetales bovinos contaminados con el mismo (Polak *et al.*, 2008) El aislamiento se realiza a partir de suero, sangre, tejidos fetales, piel, secreciones como descarga nasal, secreción vaginal, semen entre otros (Saliki y Dubovi, 2004).

ii.ix.ii Detección de Antígeno

Los antígenos virales son detectados por inmunohistoquímica en tejidos, biopsias, muescas de oreja, improntas y cultivos celulares, mediante el empleo de mAbs o anticuerpos policlonales marcados con alguna molécula fluorescente o acoplados a peroxidasa y visualizados por inmunofluorescencia (IF) o inmunoperoxidasa (IP) y con ello se puede confirmar el aislamiento viral, ya que algunas cepas pueden no inducir efecto citopático (Houe *et al.*, 2006).

Las biopsias y muescas de oreja han provisto una herramienta en la detección de niveles altos de viremia y antigenemia en animales PI y no se ven afectados por la presencia de anticuerpos calostrales (Munoz-Zanzi *et al.*, 2000). La toma de muesca de oreja ha resultado ventajosa ya que es etiquetado el animal que ha sido diagnosticado y a la vez se realiza el muestreo del tejido (Kuhne *et al.*, 2005). La identificación de los animales PI, es un reto importante ya que representan un riesgo permanente en los hatos y su eliminación podría establecer un control y el establecimiento de buenas medidas de bioseguridad (Fulton *et al.*, 2009).

Otra técnica de detección de antígeno a través de suero, es mediante el uso de la técnica de ensayo inmunoenzimático acoplado a enzimas (ELISA) de captura (AC), la cual emplea mAbs y tiene como fundamento inmovilizar un antígeno en particular, como pueden ser proteínas de superficie (Erns) u otra proteína no estructural, como NS3 o la Erns (Sandvik, 2005). Los sistemas de ELISA producen una reacción colorimétrica medida por valores de densidad óptica (OD) corregida o relativa y tienen la ventaja de ser técnicas rápidas y más económicas, ofreciendo una alta sensibilidad y especificidad y es muy utilizada para el diagnóstico a partir de muescas de oreja (Houe *et al.*, 2006)

ii.ix.iii Detección de Anticuerpos

Se realiza mediante la utilización de pruebas serológicas, que tienen la capacidad de medir títulos de anticuerpos, como la virus-neutralización (VNTs) o ELISA. Los resultados son muy variables ya que existe una gran diversidad antigénica entre las diferentes cepas (Saliki y Dubovi, 2004).

ii.ix.iv Seroneutralización

Determina el título de anticuerpos capaces de inhibir la replicación viral en cultivo. Al emplear cultivos celulares se debe certificar que estén libres VDVB. Los anticuerpos detectados están dirigidos contra epítopes de la proteína E2, la cual es una de las regiones más variables del genoma entre las diferentes cepas, haciendo que los resultados de seroneutralización sean variables entre las diversas cepas y aislados virales. Es una técnica laboriosa y resulta ser muy costosa debido a que es necesario contar con herramientas para el cultivo celular. (Houe *et al.*, 2006)

ii.ix.v Detección de genoma

La presencia de RNA es principalmente detectada por medio de la prueba de transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa, (RT-PCR). Que ofrece una alta sensibilidad, por lo que puede ser adecuada para muestras con una baja cantidad de virus como leche y grupos de muestras de suero o plasma. La amplificación por PCR se fundamenta en la capacidad de que oligonucleótidos específicos se unan a secuencias blanco como la UTR 5' y NS2-3, que se encuentran altamente conservadas entre los diversos virus de VDVB (Vargas *et al.*, 2009).

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

La RT-PCR ha tenido amplia distribución como método de diagnóstico y a su vez es utilizada para realizar genotipificación de cepas, permitiendo distinguir genotipos y subgenotipos (Saliki y Dubovi, 2004). Para la realización de esta prueba se emplean diversas muestras como leche, órganos homogenizados, exudados, sangre, suero, biopsias entre otros, posteriormente el RNA viral se purifica y se transcribe a DNA complementario (cDNA), mediante el uso de enzimas transcriptasa reversa y poder ser utilizado como cadena molde para el PCR.

ii.x Control y prevención

La utilización de pruebas diagnósticas en los programas de control permiten la vigilancia y su monitoreo, la combinación de varias técnicas asegurará la identificación de los animales PI (Pogranichniy *et al.* 2011). Algunos países han instaurado programas de erradicación de la enfermedad, basados en conocer las cepas circulantes en rumiantes silvestres, realizando investigaciones serológicas y virológicas de VDVB y saber acerca de las posibles interacciones entre los rumiantes domésticos y silvestres, así como los biotipos presentes y su distribución geográfica (Casaubon *et al.*, 2012).

Otros países como Suecia, Noruega, Dinamarca, Finlandia y Austria, utilizan programas de erradicación, que están basados en los rebaños cerrados y la eliminación de animales PI y mantener sus condiciones de bioseguridad cuando es necesaria la introducción de animales, cuarentenando para controlar la expansión entre los rebaños (Kampa, 2005).

ii.x.i Vacunación

El principal objetivo de la vacunación es inducir un nivel suficiente de inmunidad protectora para prevenir la infección transplacentaria de los fetos y el nacimiento posterior de animales PI (Reber *et al.*, 2006). La vacunación asegura que la protección de un grupo aumente y que la infección natural disminuya, sin embargo hay dificultades en la ejecución de los programas de vacunación, se ha reportado por diversos autores que en países como Canadá, Bélgica, Alemania y Japón, una alta presencia de VDVB tipo 2 y la mayoría de las vacunas disponibles utilizan virus del tipo I (Pellerin *et al.*, 1994; Letellier *et al.*, 1999; Ridpath *et al.*, 2000, Tajima *et al.*, 2001).

En México existen vacunas de virus activo y vacunas de virus inactivo, que la mayoría refiere que contiene virus citopático, no citopático y virus tipo I y tipo II (PLM, 2012), los laboratorios que producen estas vacunas no describen las cepas utilizadas para su elaboración (Ver Tabla 2 y Tabla 3) y no se sabe si han sido eficaces ya que no existe evidencia de una reducción significativa en la seropositividad reportada y de los casos reportados con signos clínicos de la enfermedad tampoco hay disminución y por lo tanto no existe un control de la infección (Vargas *et al.*, 2009) creando además el riesgo de recombinación entre las cepas vacúnales y las cepas de campo (Reza, 2010, Pogranichniy *et al.*, 2011)

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

NOMBRE DE LA VACUNA	LABORATORIO	TIPO DE ANTÍGENO	RESPUESTA INMUNE QUE PRODUCE	COSTO EN PESOS MXN
Pyramid® 5MLV Reg. SAGARPA B-0171-145	Boehringer Ingelheim Vetmedica	Virus activo modificado de Diarrea Viral Bovina (BVD) cepa Singer tipo I y cepa 5912 tipo II	Celular	10 dosis: \$400.00
Arsenal® 4.1 Reg. SAGARPA B-0715-044	Novartis Salud Animal, S.A. de C.V.	Contra DVB tipos 1 y 2 virus activos modificados	Celular	10 dosis: \$675.00
Bayovac BRSV VAC 4mr Reg. SAGARPA B-0615-032	BAYER DE MEXICO, S. A. de C. V.	Virus de la diarrea viral bovina activo modificado (DVB).	Celular	10 dosis: \$455.00
Bovimune Protector® 5 Reg. SAGARPA B-2083-021	Lapisa, S.A. de C.V.	Virus vivos modificados de Diarrea Viral Bovina (DVB) tipo I y tipo II	Celular	10 dosis: \$385.00
Express® FP 5 Hs Reg. SAGARPA B-0171-018	Boehringer Ingelheim Vetmedica	Vacuna combinada con virus vivos modificados de DVB tipos 1 y 2	Celular	10 dosis: \$385.00
Titanium 5 Reg. SAGARPA B-0042-028	Virbac	Vacuna múltiple liofilizada de Virus vivo modificado de Diarrea Viral Bovina Tipo I cepa Oregon C24V Virus vivo modificado de Diarrea Viral bovina Tipo II cepa 296	Celular	10 dosis: \$365.00
Jencine 4 Reg. SAGARPA Q-0552-052	Intervet	Virus activo modificado de diarrea viral bovina tipo 1 (BVD) $1.0 \times 10^{3.7}$ FAID50	Celular	10 dosis: \$298.00
Bovishield +one shot	Pfizer	Vacuna a virus vivo modificado, diarrea viral bovina, parainfluenza 3 y virus respiratorio sincitial bovino y pasteurelosis ocasionada por Pasteurella (Mannheimia) haemolytica A	Celular	10 dosis: \$443.00

Tabla 2. Vacunas de virus activos, atenuados (PLM, 2012)

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

NOMBRE DE LA VACUNA	LABORATORIO	TIPO DE ANTÍGENO	RESPUESTA INMUNE QUE PRODUCE	COSTO EN PESOS MXN
VIRA SHIELD® 6 Reg. SAGARPA B-0715-013	Novartis Salud Animal, S.A. de C.V.	Cultivos inactivados, altamente antigénicos de virus de diarrea viral bovina (DVB) (tipo 1 no citopático y tipo 2 citopático y no citopático)	Humoral	10 dosis: \$480.00
Bayovachorizon 9 con prolong Reg. SAGARPA B-0615-004	BAYER DE MEXICO, S. A. de C. V.	Virus inactivado de diarrea viral bovina (DVB).	Humoral	de 10 dosis: \$795.00 de 25 dosis: \$1,580.00
Boviral-3 Reg. SAGARPA B-1069-019	LABORATORIOS TORNEL, S.A.	virus inactivados de DVB (Diarrea Viral Bovina) DVB cepas citopática NADL (TIPO 1) y cepa no citopática New York (TIPO 2)	Humoral	10 Ds–50 ml: \$473.00 50 Ds–250 ml: 1,787.00
Triangle® 9 + BVD Tipo II Reg. SAGARPA B-0171-141	Boehringer Ingelheim Vetmedica	Virus inactivado de Diarrea Viral Bovina (BVD) Cepa Singer tipo I y cepa 5912 tipo II.	Humoral	10 dosis: \$370.00
Elite® 9Hs Reg. SAGARPA B-0171-108	Boehringer Ingelheim Vetmedica	Contiene antígenos inactivados de virus de diarrea viral bovina (BVD)	Humoral	10 dosis: \$500.00 ~

Tabla 3. Vacunas de virus inactivos (PLM, 2012)

III.Objetivos

iii.i Objetivo general

- ✓ Caracterizar genotípicamente aislados de Virus de Diarrea viral bovina en muestras de bovinos recién nacidos no vacunados

iii.ii Objetivos particulares

- ✓ Propagar virus de referencia (**ATCC**)
- ✓ Obtener como antígeno los virus de referencia y vacúnales para estandarizar la RT-PCR.
- ✓ Estandarización del RT-PCR
- ✓ Verificar la identidad de los productos por secuenciación.
- ✓ Genotipificar los virus aislados
- ✓ Analizar filogénicamente las secuencias obtenidas

IV. Justificación

En México se sabe poco acerca de los agentes infecciosos que causan el aborto y enfermedad respiratoria en ganado bovino (Meléndez *et al.*, 2010).

Existen pocos estudios que revelen la prevalencia, no existen disponibles estudios que mencionen las cepas circulantes presentes en el ganado bovino y en otras especies susceptibles a la infección por VDVB de México (Escamilla *et al.*, 2007).

Las vacunas existentes no reportan evidencia de una reducción significativa en la seroprevalencia reportada (Vargas *et al.*, 2009), sumada al hecho de que la mayoría de las vacunas comercialmente disponibles, se producen en base a un par de aislados pertenecientes a los genotipos de VDVB 1 y en menor medida a subgenotipos, lo que permite pensar que la población bovina vacunada no estaría totalmente protegida. Los diversos estudios han mostrado alta variabilidad antigénica del VDVB, diferencias antigénicas entre los subgenotipos, como lo demuestran las pruebas de neutralización cruzada (Botton *et al.*, 1998), unión de anticuerpos monoclonales (Donis *et al.*, 1991) y la respuesta de animales a vacunación heteróloga (Pogranichniy *et al.*, 2011). En éste contexto no se sabe, si las variaciones de los subgenotipos son suficientemente significativas como para tener un impacto en la detección o la protección por vacunación y sugiere que la protección de las vacunas se puede mejorar en base a la utilización de las cepas prevalentes de VDVB elaboradas para cada región (Ridpath, 2010). La caracterización de los virus de diarrea viral bovina de México, permitirá conocer las cepas de campo circulantes, con el fin de establecer pruebas diagnósticas más específicas y el desarrollo de vacunas seguras y efectivas, con la finalidad de establecer un control y erradicación del VDVB.

V. Material y métodos

v.i Virus y líneas celulares

Propagación de virus de referencia cepa NADL de Diarrea viral bovina (No.VR-1422 **ATCC**) y SINGER (Ramírez, Mendoza H), en cultivo celular Madin Darby Bovine Kidney (MDBK catálogo CCL-22 de **ATCC**)

v.ii Crecimiento y mantenimiento de la línea celular MDBK (Madin Darby Bovine Kidney, catálogo CCL-22 de **ATCC**)

Se descongeló la línea celular a 4 °C y posteriormente se centrifugó a 1500 revoluciones por minuto (rpm) en una microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415 R) posteriormente el botón celular se resuspendió en 1 ml de medio de crecimiento Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, **GIBCO** 12800-07) al 10% de suero fetal equino (SE, Horse fetal serum, **GIBCO** 16050122), dentro de un gabinete de bioseguridad nivel II (Nuair: UN-425400) y se vertió con una pipeta serológica a una botella de 25 cm² (**Sarstedt** 83.1810), que contenía 4 ml de medio de crecimiento pre incubado a 37 °C, se colocó en una incubadora de CO₂ (**NUAIRE** US Autoflow automatic CO₂ incubator: UN-4750) con una atmósfera de CO₂ del 0.5%, a una temperatura de 37°C y se dejó incubar 72 horas hasta obtener una monocapa confluyente del 80 al 100%, posteriormente se decantó el medio del lado contrario a la monocapa, se agregó 0.5 ml de una solución de lavado EDTA 0.5 M para retirar células muertas y detritus celular, se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 minuto, se decantó la solución, se adicionó 0.25 ml de solución de desprendimiento de Tripsina EDTA 0.25% (**ATCC**, Cat. 30-2101) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de promover el rompimiento de los enlaces intercelulares facilitando el desprendimiento de la monocapa, se colectó con una pipeta serológica estéril, se pasó a un tubo de polipropileno de 1.5 ml y se centrifugó a 1500 rpm para retirar la tripsina, posteriormente se resuspendió en medio de crecimiento para subcultivar y se distribuyeron en nuevas botellas de 25 cm². Esas botellas a su vez se crecieron en

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

el medio de mantenimiento DMEM al 8% de suero fetal equino (SE), para posteriormente ser crecidas en botellas de 75cm² con un volumen final de de 15 ml por botella, para obtener un “Stock de células” y ser utilizadas para la propagación del virus de referencia (Payment y Trudel, 1993). Se mantuvieron en crioviales a -70 °C, en medio de congelación preparado con DMSO al 10% (Dimethyl sulfoxide **ATCC**, cat. No. 4-X-5) en SE, ver Figura 11.

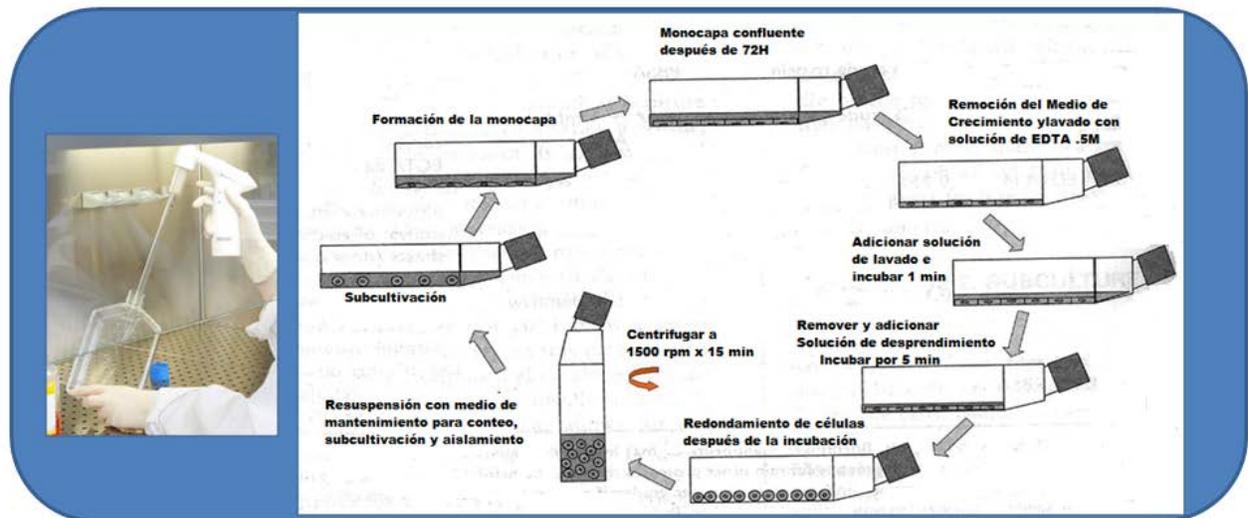


Figura 10. Diagrama de flujo, propagación y mantenimiento de la línea celular (Payment y Trudel, 1993)

v.iii Conteo celular

Se tomó 0.4 ml de una suspensión celular con una micropipeta (**Eppendorf Research plus**) de una de las botellas con una monocapa confluyente (80-100%) en un tubo de polipropileno (**Axygen MCT-150-C**) de 1.5 ml y posteriormente se adicionó 0.1ml de colorante azul tripano, se homogenizó y se tomó 10 µl para cada cámara del hemocitómetro de Neubauer y fueron llenadas por capilaridad. Se contaron las células birrefringentes o blancas (vivas) que fueron observadas en cada uno de los cuatro cuadros de esquina (cuadros 4x4) y separadamente las células azules (muertas). Las células localizadas en los márgenes externos de

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

cada esquina fueron incluidas en la cuenta. La cuenta total de células para los cuatro cuadros 4x4 se encontró entre 100 y 200 células.

Se calcularon los resultados de la siguiente manera:

Células por ml = Cuenta total de células vivas ÷ Número de cuadros 4x4 evaluados x factor de dilución x 10x10⁴.

Células totales = Células por ml x volumen (en ml) total del cual fueron extraídas las células evaluadas.

Se realizó el conteo para familiarizarse con las condiciones necesarias para la supervivencia y proliferación celular y de este modo establecer las condiciones mínimas de cultivo para un comportamiento celular adecuado (Payment y Trudel, 1993).

v.iv Propagación de virus de referencia

Se infectaron botellas de 25 cm² con 0.1 ml del virus semilla, dejando incubar el inoculo a 37 °C en agitación (Agitador orbital, Fine PCR, **Daigger** CR 100) para promover la adsorción del virus, en un período de 1 hora, posteriormente se decantó el inoculo y se completó con medio al 2% de SE y se incubó a 37 °C en atmosfera de CO₂ y se registró su efecto citopático: 24, 48 y 72 horas post infección (p.i). Se cosechó el virus a las 72 horas, se mezcló por pipeteo hasta desprender mecánicamente las células que estaban adheridas a la botella de cultivo, se transfirió la suspensión celular a tubos tipo Falcon de 15 ml (62.553.001, Sarsted) y se sonicaron por 10 minutos (Electroporador, **Branson**/5510) para separar el detritus celular del virus se centrifugó a 1500 rpm (revoluciones por minuto), en una centrífuga refrigerada (**Sorvall**, Legend RT).

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

v.v Titulación de virus por el método de Dosis Infecciosa 50 (DICT₅₀ / DI₅₀)

La infectividad de las suspensiones virales se determinó en monocapas de células, crecidas en placas de 96 pozos en medio D-MEM con 2% de suero fetal equino (SE). Los pozos se infectaron con diluciones seriadas de la suspensión viral 1:3 en medio fresco D-MEM con 2% de SE, hasta una dilución final de 1.3×10^{-6} , incubándose 1 hora para permitir la adsorción del virus, en agitación (Agitador orbital, Fine PCR, **Daigger** CR 100), retirando posteriormente el inóculo y agregando medio fresco (DMEM-2%SE), cada ensayo se realizó por cuadruplicado. Las placas se incubaron hasta la observación del efecto citopático hasta las 72 horas ver Figura 12. El título viral se expresó en DICT₅₀ y se determinó utilizando la fórmula de Reed-Muench (Payment y Trudel, 1993).

Fórmula de Reed-Muench, DICT 50%, punto final es igual a:

$$\text{Dilución donde ECP es } >50\% + \frac{(\% \text{ positivos arriba de } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positivos arriba de } 50\%) - (\% \text{ positivos abajo del } 50\%)} \times \log 10^{10}$$

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

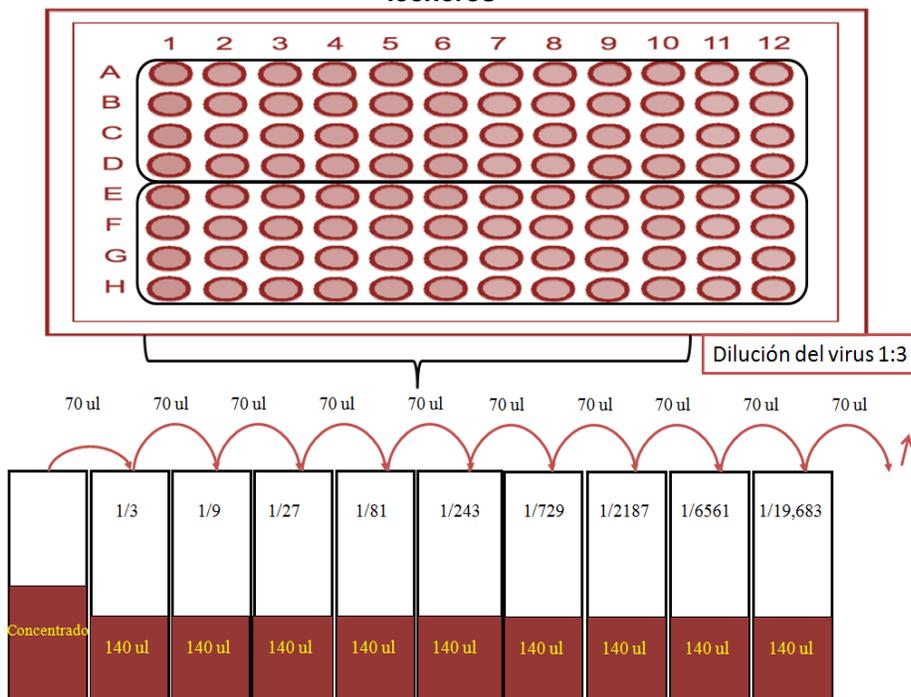


Figura 11. Esquema de placa y diluciones realizadas para la titulación por DICT50 (Payment y Trudel, 1993)

v.vi Viabilidad celular por liberación de cristal violeta

La infectividad de las suspensiones virales se determinó en monocapas de células MDBK, se crecieron en placas de 96 pozos en medio D-MEM con 2% de SE. Los pozos se infectaron con diluciones seriadas de las suspensiones virales 1:3 en medio D-MEM con 2% de SE, hasta una dilución final de 1.2×10^{-6} , incubándose 1 hora para permitir la adsorción del virus, en agitación (Agitador orbital, Fine PCR, **Daigger** CR 100) retirando posteriormente el inculo. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado. Las placas se incubaron hasta la observación de ECP (3 días). Se fijaron con metanol frío 5 minutos y posteriormente se tiñeron con cristal violeta (PBS 1% cristal violeta, etanol 75%) durante 20 minutos, se lavó con agua corriente, el colorante se liberó con ácido acético al 10% disuelto en agua destilada. Se determinó la densidad óptica (DO) a 620 nm, en un lector de ELISA (Modelo Multiskan ex - corporation **Thermoelectron**). Se calculó el porcentaje de

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

viabilidad de las células infectadas, usando la DO obtenida en el testigo negativo como el 100% de viabilidad. El método está basado en el principio de que las células que se encuentran sanas o con sus membranas intactas no se teñirán y podrán excluir el colorante, en el caso de las células muertas se encontraran teñidas por cambios en la conformación en su membrana, que permiten que se internalice el colorante (Stoddart, 2011).

v.vii Extracción de RNA viral de vacunas comerciales por el método de Trizol

Se obtuvieron vacunas comerciales que referían contener Virus de Diarrea Viral Bovina tipo I y II, citopático y no citopático (Bovimune Master L5 – **Lapisa**, Bovishield gold – **Pfizer**, Bayovac Horizon 9 – **Bayer**, Pyramid 10 – **Fort Dodge**), las cuales fueron utilizadas para la obtención de RNA.

Se centrifugó 2ml de cada una de las vacunas, una vez hidratadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante a 14000 rpm, en tubos de polipropileno de 2 ml, libres de DNAsas, RNAsas y se realizó como sigue:

- Se agregó 0.5 ml de trizol a la pastilla obtenida por centrifugación, se dejó incubar 15 min, posteriormente se agregó 250 µl de cloroformo puro de grado molecular y se mezcló en vórtex en un período de 1 min, se centrifugó a 10 000 rpm (centrífuga refrigerada **Sorvall**, Legend RT), se colectó el sobrenadante y se colocó en un tubo de 1.5 ml que contenía isopropanol absoluto frío de grado molecular y se mantuvo a -20 °C toda la noche, para precipitar eficientemente el RNA, se centrifugó a 10 000 rpm por un período de 10 min y se decantó el sobrenadante para así poder lavar el botón de RNA con 1 ml de etanol al 75% (**J.T Baker**), se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 min a 10 000 rpm, se decantó y dejó secando hasta que se evaporó el etanol, el tubo se colocó horizontalmente y abierto sobre una toalla de papel absorbente limpia, por un período de 15

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

min, posteriormente se hidrató el botón con 50 µl de agua DEPC y se conservó a -70 °C, hasta su uso.

v.viii Verificación de la integridad del RNA y cuantificación

Se verificó el RNA obtenido en geles de agarosa al 0.7% (16500100 ultrapure agarose, invitrogen), corridos a 80 Volts (V), en una cámara de electroforesis (Owl easy cast B1, **Thermo scientific**), conectada a una fuente de poder (EC105, **Thermoelectron**) para validar los métodos de extracción de RNA utilizados.

Se cargó 5µl de muestra con 1 µl de buffer de carga 6X (10482028 racklt Cyan/Orange Loading Buffer 6x, **Invitrogen**), en cada pozo del gel y se dejó corriendo a 80 V, en un tiempo de 40 min que es el tiempo en el que llegó a migrar hasta $\frac{3}{4}$ del gel de agarosa. Finalmente se tiñó con una solución de bromuro de etidio de 0.5 µg/ml (15585011 UltraPure™, **Invitrogen** 10 mg/ml Ethidium Bromide) para observar la integridad del RNA.

El RNA obtenido fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro de pedestal (Nanodrop 2000, **Thermo scientific**).

Para la cuantificación de ácidos nucleicos, se utilizó el software del equipo que integra la ecuación de Lambert-Beer modificada con un factor de corrección de unidades de nanogramo por microlitro (ng/microlitro).

La ecuación modificada para los cálculos de ácido nucleico es la siguiente:

$$c = (A * \epsilon) / b$$

c = La concentración de ácido nucleico en ng/microlitro

A = La absorbancia

ϵ = La longitud de onda dependiente del coeficiente de extinción en ng/microlitro

b = La longitud de recorrido en cm

El coeficiente de extinción para RNA: 40 ng-cm/µl

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

v.ix Síntesis del cDNA método de transcriptor **Roche**

Para la estandarización de los RT-PCR, se realizó inicialmente la síntesis de DNA complementario a partir de RNA total, utilizando el kit comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (04379012001 **ROCHE**), adicionando los componente con base a la tabla 4 y con las instrucciones:

- Se realizó una mezcla inicial de cadena molde desnaturalizado y cebador, con 5 µl de RNA, más 2 µl de oligonucleótido específico reversa (VDVB UTR 5') y 6 µl de Agua de grado molecular, que fue mezclada por pipeteo por 10 ocasiones para obtener una mezcla homogénea, la mezcla fue incubada en el termociclador Mastercycler gradient a 65°C por 10 minutos y se pasó a hielo, posteriormente se realizó una mezcla maestra “síntesis de cDNA” para las muestras según Tabla 6. Secuencias y tamaño de fragmento esperados para los cebadores específicos de VDVB, por cada reacción de síntesis y se dispensó 7 µl a cada tubo de reacción, posteriormente se incubó 30 min a 55°C, 85° C por 5 minutos, para inactivar la Transcriptor Reverse Transcriptase. Finalmente se colocó en hielo para detener la reacción y se conservó a -20°C, hasta su uso.

Componente	Volumen de reacción
RNA	5µl
Iniciador específico Reversa (0.6µM)	2 µl
Agua de grado molecular	6µl
Transcriptor Reverse transcriptase Reaction Buffer, 5X	4ul
Protector RNase inhibitor	0.5µl
Deoxynucleotide Mix (10 mM)	2ul
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/ul)	0.5ul

Tabla 4. Componentes de la reacción de síntesis de cDNA método de transcriptor Roche.

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

v.x Síntesis del cDNA método de SuperScript™ II Reverse Transcriptase

Se realizó una mezcla con un volumen final de 20 µl por reacción en la que se utilizó 5ul de RNA y se agregaron los componentes de acuerdo a la tabla 5, la mezcla fue incubada en el termociclador Mastercycler gradient a 65°C por 5 min y se pasó a hielo posteriormente se adicionó, la mezcla de síntesis se mezcló por pipeteo 10 ocasiones y se incubó a 42°C por 2 min.

Posteriormente se adicionó 1 µl de SuperScript™ II RT (18064-014, *Invitrogen*) y se mezcló gentilmente por pipeteo y se adicionó agua de grado molecular estéril para completar un volumen de 20 µl, se incubó a 42°C por 50 min y se inactivo la reacción con una incubación de 70°C por 15 min y se conservo a -20 °C hasta su uso.

Componente	Volumen de reacción
RNA	5µl
Iniciador específico Reversa (2pMole)	1µl
dNTP Mix (10 mM)	1µl
Agua de grado molecular	5ul
5X First-Strand Buffer	4µl
0.1 M DTT	2ul
RNaseOUT™ (40 units/µL) Opcional*	1ul
SuperScript™ II RT (200 units)	1 ul

Tabla 5. Componentes de la reacción de síntesis de cDNA método de SuperScript™ II Reverse Transcriptase

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

v.xi Estandarización del RT-PCR de región UTR 5' utilizando los virus de referencia

Las condiciones del RT-PCR para los iniciadores diseñados que corresponden al fragmento de 293 pb de la región UTR 5' de la patente: **MX/E/2012/081439** (Ver Anexo 1), fueron estandarizadas en el instrumento Mastercycler gradient (950000058, **Eppendorf** de 96 pozos). En el que se probaron gradientes que iban de 50 hasta 65 °C, diferentes kits comerciales, encontrando que a una temperatura de 55 °C, con el kit de RT-PCR, one step de **Qiagen** (210212), se definían perfectamente bandas únicas que corresponden a los fragmentos esperados; las condiciones se establecieron del siguiente modo:

Se utilizó como cadena molde el RNA obtenido de vacunas comerciales que referían contener Virus de Diarrea Viral Bovina tipo I y II, citopático y no citopático (Bovimune Master L5 – **Lapisa**, Bovishield gold – **Pfizer**, Bayovac Horizon 9 – **Bayer**, Pyramid 10 – **Fort Dodge** y mediante la utilización del RNA obtenido de los virus de referencia (NADL y SINGER). Logrando amplificar los fragmentos esperados a partir del RNA de las vacunas y el virus, teniendo amplificados para cada uno de ellos. Los volúmenes para la mezcla de reacción y el programa se describen en la figura 16 y la tabla 7.

v.xii Toma de muestras clínicas, sangre total y muesca de oreja

Se muestrearon 22 becerras de no más de una semana de vida y sin vacunar, procedentes de la cuenca lechera de Tizayuca de 4 diferentes establos. A las que se les colectó una muestra sanguínea, mediante el uso de tubos vacutainer con heparina que fue previamente identificado (367884, **Becton Dickinson**), se utilizó agujas de 25 mm (**Becton Dickinson**, 360212 Precision Glide Needle 21G x 1" Green) para tomar las muestras sanguíneas de la vena coccígea. Una vez inmovilizadas las becerras se levantó la cola en línea recta para exponer la zona

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

del ano y de esta forma poder acceder a la vena, se limpió la zona con un antiséptico. La aguja se coloca en el punto medio del canal de la cola, después de palpar la ubicación de las vértebras, ya localizadas se introdujo la aguja en línea horizontal hasta sentir el hueco por donde pasa la arteria, se colocó el tubo para poder extraer la muestra, se empujó un poco el tubo para que el vacío succionará la sangre, lleno el tubo se mezcló por inversión y se conservó verticalmente dentro de una hielera a 4 °C, posteriormente se trasladaron al laboratorio para su procesamiento.

Para la toma de la biopsia o muesca de oreja se etiquetaron previamente los crioviales con los datos de cada becerro. Se prepararon dos recipientes limpios y estériles de vidrio, uno con agua destilada estéril y otro con un desinfectante de Glutaraldehído al 2% con activador en polvo (**GAFIDEX**, Farmacéuticos Altamirano) 7 ml, aproximadamente. Se enjuagó el instrumento para realizar el corte, pinza muescadora (8 mm, accesorios **Propet**) u horadador con el desinfectante y se enjuagó con agua destilada, estéril para evitar contaminaciones. Posteriormente se colocó el horadador en la punta de la oreja de cada becerro y se presionó para desprender un trozo de oreja de aproximadamente 1 cm y se colocó en un criovial limpio y estéril, se cerró y fue conservado en un termo de nitrógeno líquido, hasta su uso. La pinza fue lavada y enjuagada entre cada becerro. Enjuagando primero con agua destilada estéril, después con el desinfectante y por último un enjuague con agua estéril.

v.xiii Separación de linfocitos de sangre total mediante el método de lymphoprep.

La sangre colectada fue separada mediante el uso del kit lymphoprep (1114740, **Axis-shield**) como sigue:

Se diluyó la sangre en un volumen equivalente de una solución cloruro de sodio 0.9% (0.0% NaCl), cuidadosamente se agregó 6 ml de la sangre diluida en un tubo que contenía 3 ml de Lymphoprep™ en un tubo tipo falcon de 15 ml y se mezcló 3 ocasiones por pipeteo. Posteriormente se centrifugó a 800 g (gravedades) o 2500 rpm, por un período de 20 minutos a temperatura ambiente.

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

Después de la centrifugación se separó la banda correspondiente a los linfocitos en la interfase que se formó y se colectó por aspiración la muestra y se conservó a -70°C hasta su uso.

v.xiv Aislamiento viral

Se seleccionaron las muescas de oreja correspondientes a las becerras que resultaron ser positivas al RT-PCR de la sangre y se tomó aproximadamente 4 mm de la biopsia, en condiciones de esterilidad, cortando con un bisturí estéril el tejido requerido para el inóculo para monocapas de MDBK confluentes, crecidas en cajas de 6 pozos (140675, **NUNC**). Los fragmentos del tejido fueron lavados con PBS/penicilina/estreptomicina- 100 mg/ml (15140-122, **GIBCO**), para así evitar la contaminación por microorganismos ambientales presentes en las becerras. El PBS empleado para el lavado fue utilizado para la obtención de RNA por medio de la técnica del trizol (15596-026, **Invitrogen**) y de ése modo poder establecer si es suficiente para la obtención de RNA e identificar la presencia del virus, mediante la técnica de la RT-PCR. El tejido lavado fue inoculado en las monocapas confluentes, en placas de 12 pozos en DMEM con SE al 2% + antibiótico (penicilina/estreptomicina/gentamicina = 100mg/ml-100mg/ml-50mg/ml), incubadas a 37° C en una atmosfera del 5% de CO₂., registrando su efecto citopático hasta las 72 horas p.i. Posteriormente se retiraron las monocapas con el medio y fueron centrifugadas a 1,500 rpm, y se recuperó el sobrenadante que fue utilizado para realizar 2 pases ciegos posteriores en 3 placas nuevas de 6 pozos, con las mismas condiciones. Las células recuperadas fueron utilizadas para la obtención del RNA viral, mediante el método de Trizol y consiguientemente se realizó la RT-PCR, para verificar la infección de las mismas. Cabe mencionar que se utilizó un pozo como testigo positivo, uno inoculado con el virus de referencia y otro negativo sin inóculo viral pero tratado en las mismas condiciones. En cada uno de los pases ciegos se realizó el RT-PCR ver figura 13.

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

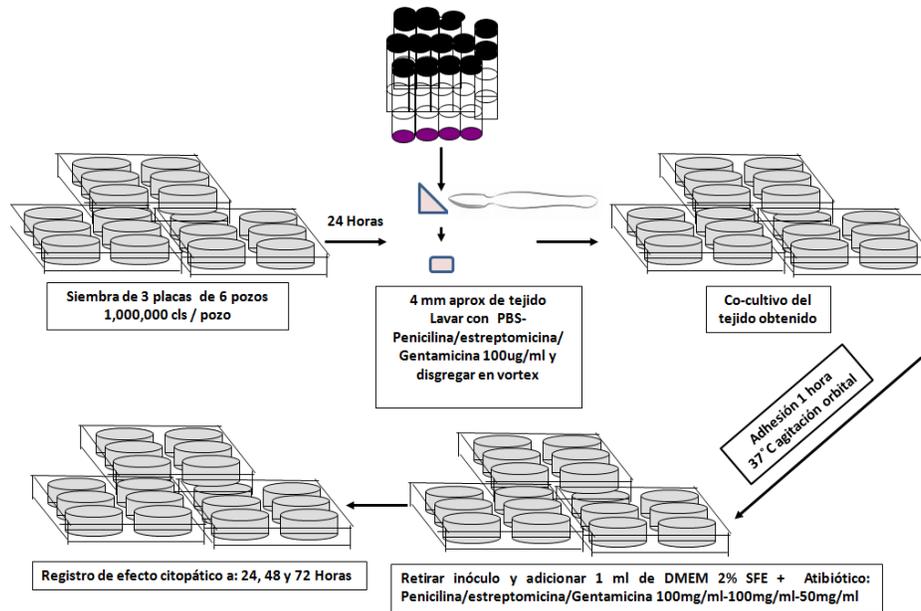


Figura 12. Diagrama de flujo, aislamiento de virus a partir de tejido en la línea celular (Payment y Trudel, 1993)

v.xv Extracción de RNA de muestras clínicas por método de trizol

Los botones celulares obtenidos en la separación de linfocitos fueron utilizados para la extracción de RNA total por el método de trizol, así como 4mm de cada biopsia de oreja y lavados de las biopsias con PBS como sigue:

- Se agregó 0.5 ml de trizol a las células obtenidas y a cada biopsia de oreja, se dejó incubar 15 min, posteriormente se agregó 250 µl de cloroformo puro de grado molecular y se mezcló en vórtex (Zx³ **VELP SCIENTIFICA**) en un período de 1 min, se centrifugó a 10 000 rpm (Centrífuga refrigerada **Sorvall**, Legend RT), se colectó el sobrenadante y se colocó en un tubo de 1.5 ml que contenía isopropanol absoluto frío de grado molecular y se mantuvo a -20 °C toda la noche, para precipitar eficientemente el RNA, se centrifugó a 10 000 rpm por un período de 10 min y se decantó el sobrenadante para así poder lavar el botón de RNA con 1 ml de etanol al 75% (JT9401-3, **J.T. Baker**) se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm, se decantó y dejó secando hasta que se evaporó el

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

etanol, el tubo se colocó horizontalmente y abierto sobre una toalla de papel absorbente limpia, por un período de 15 min, posteriormente se hidrato el botón con 50 µl de agua DEPC y se conservó a -70 °C, hasta su uso.

v.xvi Purificación de RNA obtenido a partir de las biopsias de oreja por columna (QIAamp® MinElute® Virus Spin, **Qiagen**)

El RNA obtenido por el método de Trizol fue purificado utilizando las columnas del kit de **Qiagen** como sigue:

Se adicionó 200 µl de AL-RNA carrier al RNA obtenido y se mezcló por pipeteo, posteriormente se agregó 200 µl de etanol absoluto de grado molecular a la mezcla y se incubó 5 minutos, se transfirió a la columna QIAamp MinElute y se centrifugó a 8000 rpm por un período de 1 minuto, se desechó el tubo colector y se ensambló la columna en un colector nuevo. Se adicionó 500 µl del buffer Aw1, se centrifugó a 8000 rpm por un minuto, se desechó el colector, se volvió a ensamblar la columna en un tubo colector nuevo, se adicionó 500 µl del buffer Aw2, centrifugando a 8000 rpm por 1 min, se desechó el tubo colector se ensambló en otro colector y se agregó 500 µl de etanol absoluto se centrifugó nuevamente a 8000 rpm por 1 minuto, se decantó y se centrifugó a la máxima velocidad (14,000 rpm) por 3 minutos, hasta obtener la membrana de la columna seca, se incubó 3 min en un termobloque (**Eppendorf**, thermomixer comfort) a 56°C por 3 minutos y evaporar algún remanente líquido, se desechó el tubo colector y se ensambló en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregó 30 µl de agua DEPC en dos partes, primero 15 µl y al final otros 15 µl, que fueron centrifugados a 14 000 rpm por un período de 1 min, fue conservado a -70°C, hasta su uso.

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

v.xvii Diseño de cebadores para región UTR 5', Erns-E1 (E0-E1) y β actina bovina

Los cebadores o iniciadores se diseñaron y seleccionaron, utilizando el software **MEGA 5**, mediante la consulta de la base de datos del Genbank, para los diferentes genotipos del virus de la diarrea viral bovina reportados, en el caso de los oligonucleótidos para la UTR 5', se utilizó como referencia el virus NADL, con número de acceso: M31182.1.

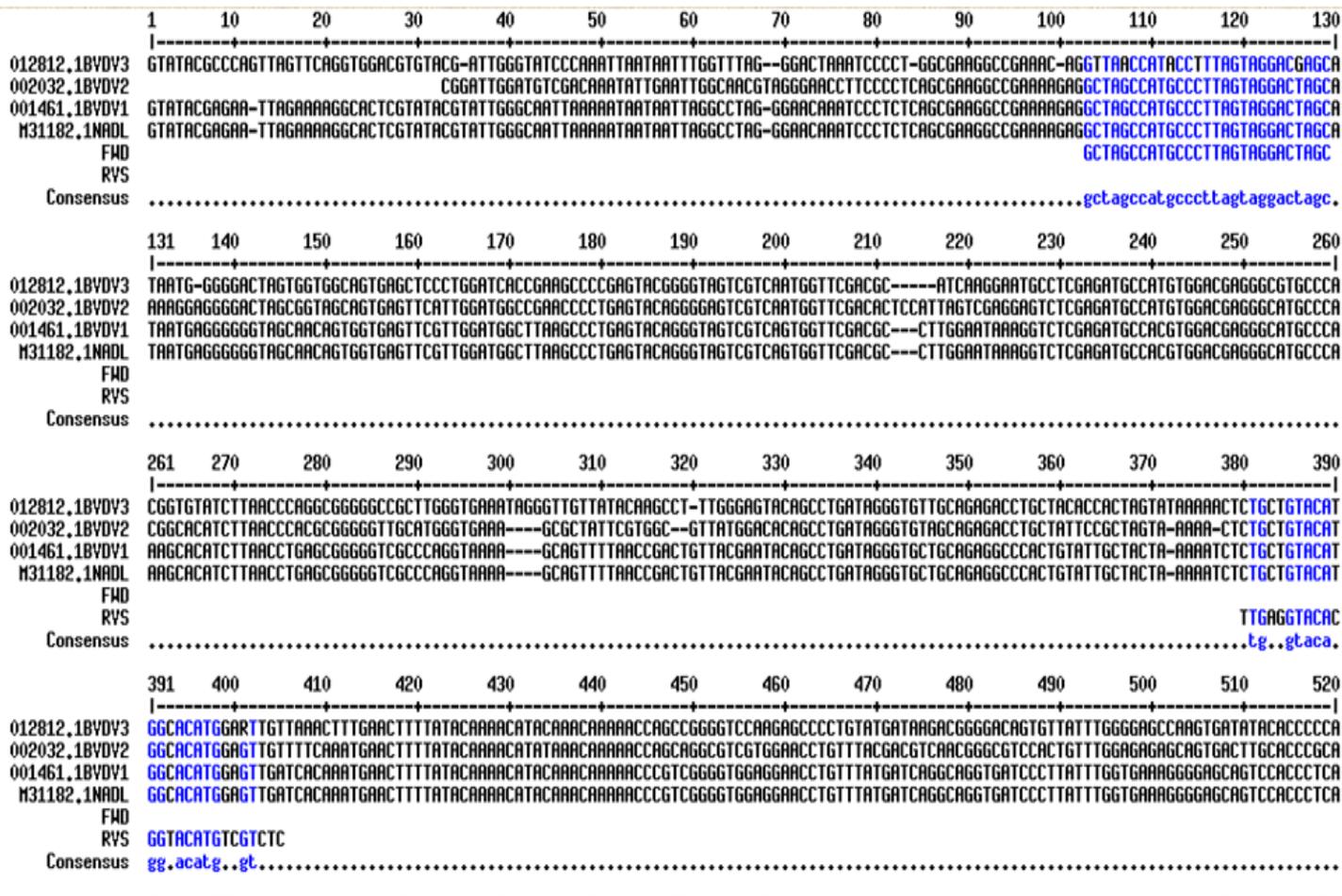
Con respecto a los iniciadores de Erns-E1, se diseñaron utilizando como referencia los virus, Bovine viral diarrhea virus 2, con número de acceso: 5224 y Bovine viral diarrhea virus 1, con número de acceso: 5418 y adicionalmente se mandaron sintetizar los cebadores correspondientes a β actina bovina en base a Tomita *et al.* (2006) que fueron sintetizados para validar los RT-PCR, ver tabla 6, Figura 14 y Figura 15.

Los cebadores fueron sintetizados en el Instituto de fisiología celular (UNAM).

Identificación	Cebadores	Región	Producto esperado
DVB	FWD GCTAGCCATGCCCTTAGTAGGACTAGC RVS AACTCCATGTGCCATGTACAGCAGAG	5'UTR	293
Externos Nested Erns-E1	FWD GAAAAAAGTTGGAAAACAAGAGTAAGACGTGGT T RVS. ATTGGTGGCCTTATGAGACAACTGCG	E0-E1	451
Internos Nested Erns-E1	FWD GGAAAACAAGAGTAAGACGTGGTTTGGAGCATA RVS TAAGACCAAATTGGTGGCCTTATGAGACAA	E0-E1	436
β actina bovina	FWD GTGGGGCGCCCCAGGCACCA RVS CTCCTTAATGTCACGCACGATTC	β actina	548

Tabla 6. Secuencias y tamaño de fragmento esperados para los cebadores específicos de VDVB

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros



Oligo Forward UTR 5'

Oligo Reverse UTR 5'

Figura 13. Posición de los cebadores de la PCR UTR 5', con respecto a virus de diarrea viral bovina I, II y III

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

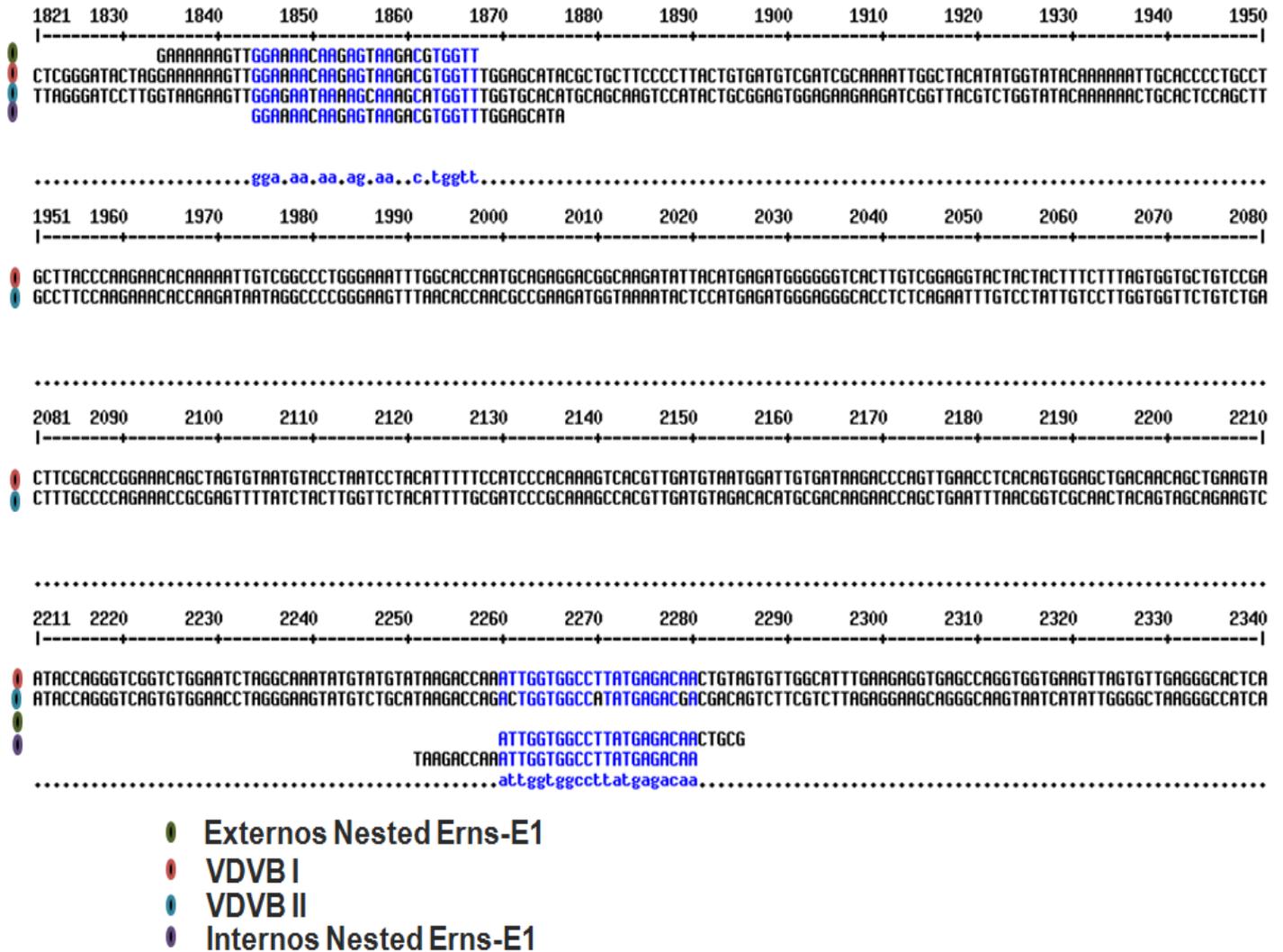


Figura 14. Posición de los cebadores de la PCR anidada Erns-E1, con respecto a secuencias reportadas en genbank, para diarrea viral I y II.

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

v.xviii Estandarización del RT-PCR de muestras clínicas

Se realizó un muestreo de 22 becerras, en 4 establos diferentes de la cuenca lechera de Tizayuca, de las cuales se obtuvieron dos diferentes tipos de muestras: Sangre total, utilizando tubos vacutainer con heparina (367884, **Becton Dickinson**), y una muesca de oreja, por medio de una pinza muescadora, usada en la ganadería para la identificación del ganado bovino. La primera para obtener, los linfocitos por medio de separación de gradiente de sacarosa (Lymphoprep TM, **Axis-Shield**), y la segunda para el aislamiento y obtención de RNA método de Trizol (Invitrogen 15596-026), según instrucciones del fabricante con la finalidad de utilizarlo como cadena molde para el RT-PCR correspondiente a la región UTR 5' del Virus de la Diarrea Viral Bovina. Se utilizó el kit **QIAGEN** OneStep RT-PCR Kit (210212) como sigue: Preparación de la mezcla de reacción para RT-PCR con base a la tabla 4. Mediante el uso del termociclador (Mastercycler gradient, **Eppendorf**) se obtuvieron los productos de amplificación con dos programas unidos, uno para la retrotranscripción y otro para la reacción de amplificación como se muestra la Figura 16 y los volúmenes de reacción para la RT-PCR, como dice en la tabla 7.

50°	30min	RT
95°	15min	
94°	2min	35x
94°	30sec	
55°	30sec	
72°	90sec	
72°	2min	1x
4°	∞	

Figura 15. Programa del RT-PCR de UTR 5'

Componente	Volumen de reacción
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	10 µL
Deoxiribonucleótidos trifosfato dNTP Mix (400 µM de cada dNTP)	2 µL
Iniciador sentido (0.6µM)	2 µL
Iniciador antisentido (0.6µM)	2µL
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2µL
RNase inhibitor (No incluido en el kit)	1µL
RNase-free water (Incluido)	9µL
RNA (Templado)	5µL

Tabla 7. Componentes de la reacción del RT-PCR

v.xix Estandarización del RT-PCR anidada de Erns y E1

El RNA obtenido por el método de Trizol (15596-026, **Invitrogen**), y purificado por columnas, de acuerdo a las instrucciones, fue utilizarlo como cadena molde para el RT-PCR correspondiente al primer round de PCR (Oligonucleótidos externos E0-E1) del Virus de la Diarrea Viral Bovina.

Se utilizó el kit **Qiagen** OneStep RT-PCR Kit (210212) como se ha descrito previamente y se preparó con base en la tabla 4. Los tubos de 0.2ml que fueron colocados dentro del termociclador (Mastercycler gradient, **Eppendorf**), con el programa descrito en la figura 22 y se tomó 1 µl de ésa reacción para utilizarla de templado para la PCR anidada, que se pudo llevar a cabo, utilizando el kit de PCR: Platinum® Taq DNA Polymerase (10966018, **Invitrogen**), con el programa descrito en la Figura 17 y adicionando los componentes con base a la tabla 8.

Componente	Volumen de reacción
10x PCR Buffer	5 µL
dNTP mixture (10 mM)	1 µL
MgCl ₂ (50 mM)	2 µL
Iniciador sentido (10 µM)	1µL
Iniciador antisentido (10 µM)	1µL
Platinum® Taq DNA Polymerase (1.0 unidad)	0.2 µL
Agua de ampolleta	38.8µL
DNA (Templado)	1µL

Tabla 8. Componentes de la reacción de-PCR

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

PCR		
94°	2 min	
94°	30 sec	45x
55°	30 sec	
72°	90 sec	
<hr/>		
72°	2 min	1x
4°	∞	

Figura 16. Programa del PCR, para la PCR anidada

v.xx Purificación de productos de PCR mediante QIAquick gel extraction

Los fragmentos de PCR amplificados fueron purificados a partir de gel de agarosa al 2% utilizando el kit comercial QIAquick gel extraction kit (28706 – **Qiagen**). Se elaboró un gel de agarosa preparativo al 2% (Owl easy cast B1, **Thermo scientific**) y se cargó todo el producto de amplificación (50 µl), se dejó correr a 80V y se visualizó por tinción con Bromuro de etidio, se seleccionó la banda que correspondía al tamaño esperando y se cortó del gel con una navaja de bisturí, se colocó el fragmento en un tubo de 1.5 ml, se pesó en un balanza analítica (Explorer, E16120, **OHAUS**). Se calculó el volumen a adicionar de Buffer QG: (100 mg ~ 100 µl), se adiciono 3 volúmenes de Buffer QG, se incubó a 50°C por 10 minutos en agitación en un termobloque (Fine PCR daigger, CR100, **Eppendorf**), hasta que se disolvió completamente y se ajustó el pH para algunas muestras con 10 µl de acetato de sodio (3 M, pH 5.0), ya que el buffer QG, tiene un colorante indicador de pH, que su coloración de trabajo óptima es amarilla, posteriormente se adicionó 500 µl de isopropanol (67-63-0, **J.T. Baker**) y se mezcló por pipeteo. La mezcla se colocó en una columna QIAquick spin, ensamblada en un tubo colector de 2 ml, se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm, se decantó el sobrenadante y

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

se repitió el proceso hasta terminar la mezcla, se adicionó 500 µl de Buffer QG y se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm, se desechó el tubo colector con el sobrenadante y se ensambla la columna en un tubo nuevo, se lavó la columna adicionando 750 µl de Buffer PE y se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm, se volvió a centrifugar para secar la columna por 1 minuto a 13,000 rpm y remover los residuos del buffer de lavado, se desechó el tubo colector y se ensambló la columna en un tubo limpio de 1.5 ml, se eluyó el DNA adicionando 20 µl de agua de grado molecular, en dos volúmenes primero 10 µl y después los 10 µl restantes y en cada elución se centrifugó a 8000 rpm por un min y se verificó la integridad del producto purificado en un gel de agarosa al 2%.

v.xxi Purificación de productos por PCR mediante E-Gel® Agarose Gel Electrophoresis System (*Invitrogen*)

Consistió en el ensamblaje de un casete que contiene un gel de agarosa al 2%, pre hidratado y pre teñido con un colorante fluorescente (Proprietary fluorescent stain), en un sistema de electroforesis (iBase™ Power System), que contiene una fuente de poder y un transiluminador, permite separar fragmentos de PCR y recuperarlos en un pocillo, utilizando un volumen de reacción de 25 µl.

Se carga el volumen de muestra total en la fila superior de los pocillos del E-Gel® SizeSelect™, se cargan 2µl de marcador de peso molecular y se completa el volumen con 23 µl de agua, los pocillos restantes se llenan de agua con 30 µl y se selecciona el programa 7, llamado size select 1-2%, con una duración de 15 minutos, en el que se observó la migración de las bandas a través del gel, utilizando unos lentes de protección (Safe Imager™ Viewing Glasses), se cercioró que los pocillos inferiores estuvieran hidratados en cada momento para la eficiente recuperación de las bandas. Las bandas se recuperaron de la fila inferior de pocillos, en un volumen aproximado de 20 µl de agua. Finalmente las bandas recuperadas se visualizaron en un E-Gel® EX 2% (G4010-02, Proprietary fluorescent stain, *Invitrogen*).

v.xxii Secuenciación y análisis filogenético

Identificación del genoma viral amplificado, de las secuencias obtenidas por análisis comparativo tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) usando la herramienta de búsqueda **NCBI BLAST**, es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, que compara una secuencia problema contra secuencias que se encuentren en una base de datos (Altschul *et al.*, 2001; Benson *et al.*, 2005). BLAST realiza una rápida comparación, utilizando un algoritmo heurístico, para construir alineaciones locales, mediante la optimización de una medida de similitud, determinando regiones similares entre un par de secuencias (Tatusova y Madden, 1999).

v.xxiii Depuración de electroferogramas y determinación de la secuencia

Los electroferogramas obtenidos de la secuenciación fueron editados y analizados empleando el programa **Sequence scanner** y el programa **CLC sequence viewer** 6.0. Las secuencias sentido y antisentido (Forward y Reverse) fueron alineadas entre sí, y además con los iniciadores diseñados, para confirmar su secuencia, y delimitar la zona esperada de 293 pb para UTR 5' y 436 pb para E0-E1. Las secuencias depuradas fueron identificadas por comparación de los virus reportados en el GenBank (Benson *et al.*, 2005) y se realizó un análisis y un árbol filogenético para establecer a que genotipo pertenece, utilizando el software **MEGA 5**.

El análisis fue realizado con el software MEGA 5. Mega es una herramienta integral para el alineamiento automático y manual de secuencias, la inferencia de árboles filogenéticos, estimación de velocidades de evolución molecular y la prueba de hipótesis evolutivas. Ha sido desarrollado por Sudhir Kumar de la Arizona State University, Koichiro Tamura de Tokyo Metropolitan University y

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

Masatoshi Nei de la Penn State University. MEGA proporciona tres diferentes algoritmos para el cálculo del árbol de la máxima parsimonia: Max-mini branch & bound, Mini-mini heuristic y Close neighbor interchange. El primero de ellos garantiza la obtención del árbol óptimo más parsimonioso y los restantes son heurísticos. Adicionalmente el programa permite la generación de replicas de cada algoritmo, utilizando la herramienta de Bootstrap para evaluar la reproducibilidad de los árboles obtenidos. Se realizó un alineamiento previo de las secuencias en estudio con otras regiones 5' no traducidas reportadas en el Genbank.

VI. Resultados

vi.i Mantenimiento de la línea celular y propagación de virus de referencia.

Se propagaron los virus de referencia cepa NADL (**ATCC**) y la cepa SINGER en la línea celular MDBK (Obsequio del Dr. Ramírez Mendoza, H.), registrando un efecto citopático a las 72 horas p.i, en el caso de NADL ver Figura 18.

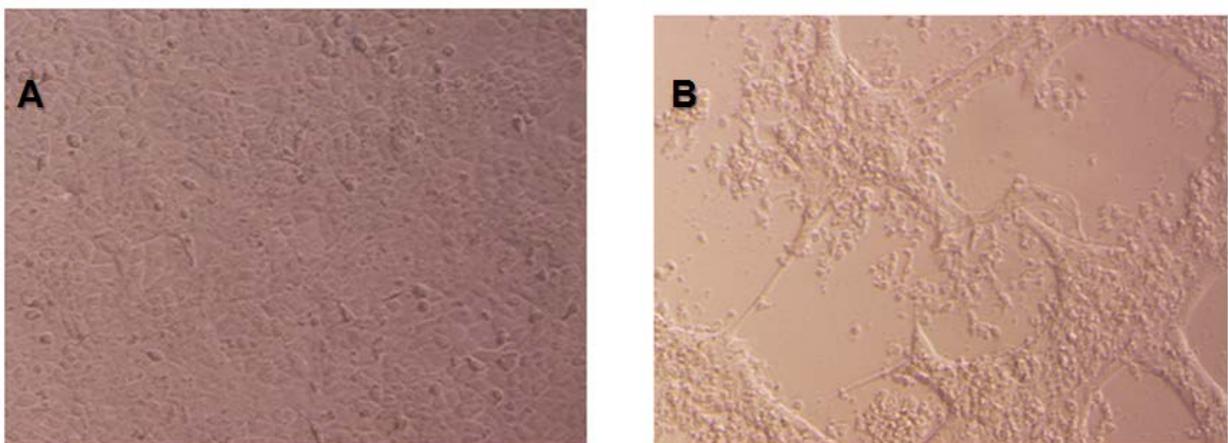


Figura 17. A: Monocapa 90% de confluencia (48H) de la línea celular MDBK, B: Efecto citopático registrado en la línea celular MDBK a las 72 H p.i, 40X

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

vi.ii Titulo viral de cepa NADL por DICT₅₀ en MDBK

Se verificó y registró el efecto citopático de NADL a las 24, 48 y 72, encontrando que a las 72 horas causa lisis, aumento de tamaño en las células y formación de vacuolas. El punto final fue la dilución 7 y el titulo viral calculado fue de DICT₅₀= 8.30E+01/ml, ver Figura 19.

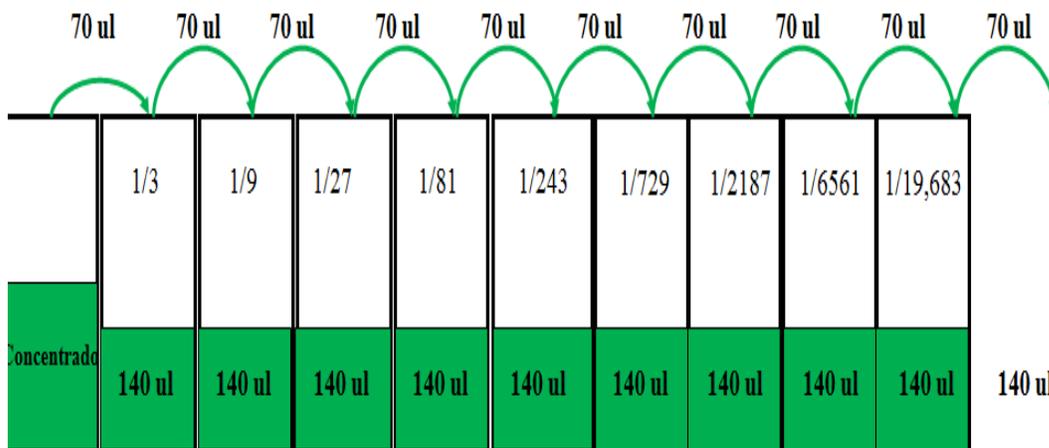
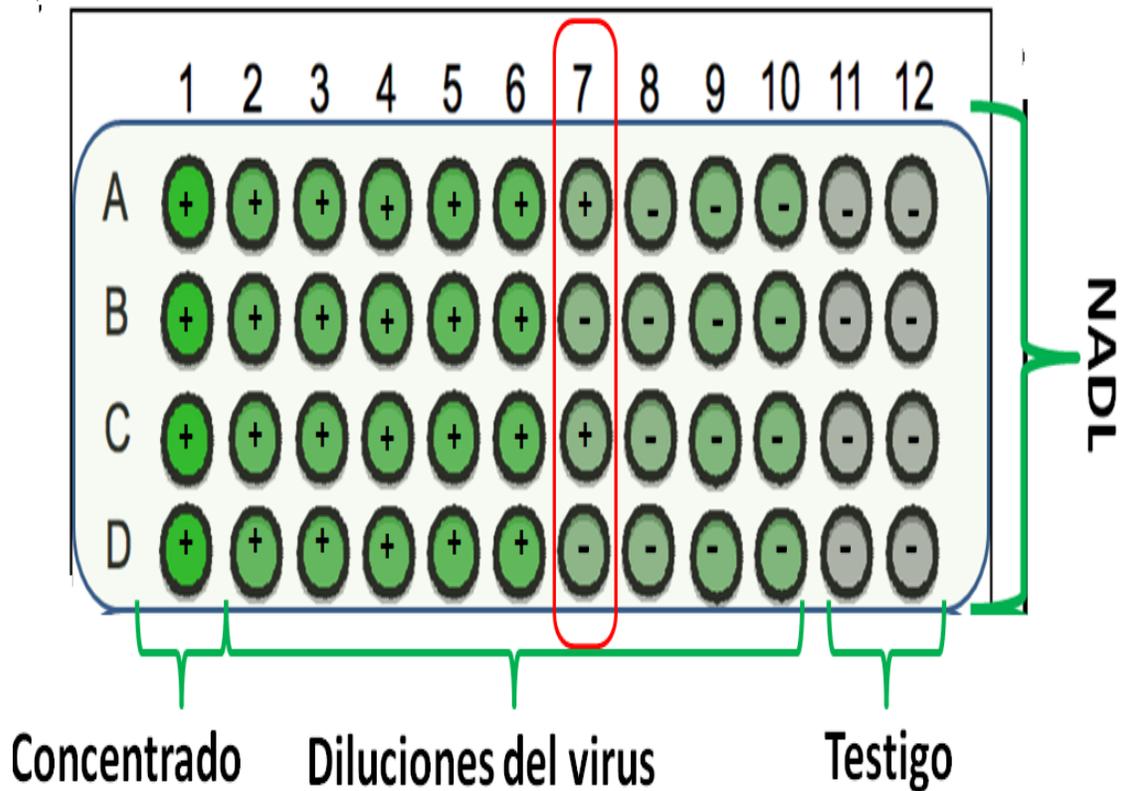


Figura 18. Esquema del efecto citopático registrado en la placa de 96 pozos, para el cálculo del título viral del virus de referencia NADL ATCC.

vi.iii Viabilidad celular del virus de referencia

Con la finalidad de verificar el efecto CP de los virus aislados de campo se realizó el ensayo para el virus de referencia y de esta manera poder comparar las muestras de campo en las que el ECP no era claro. El promedio de viabilidad celular fue del 54%, si consideramos la diferencia en Densidades ópticas (D.O) entre las células testigo y las células infectadas, obtenemos un gráfico de viabilidad estimada. Se observa que entre las diluciones 5 y 7 se induce un cambio en el efecto citopático, sugiriendo que el umbral de efecto citopático ocurre entre estas diluciones ver Figura 20.

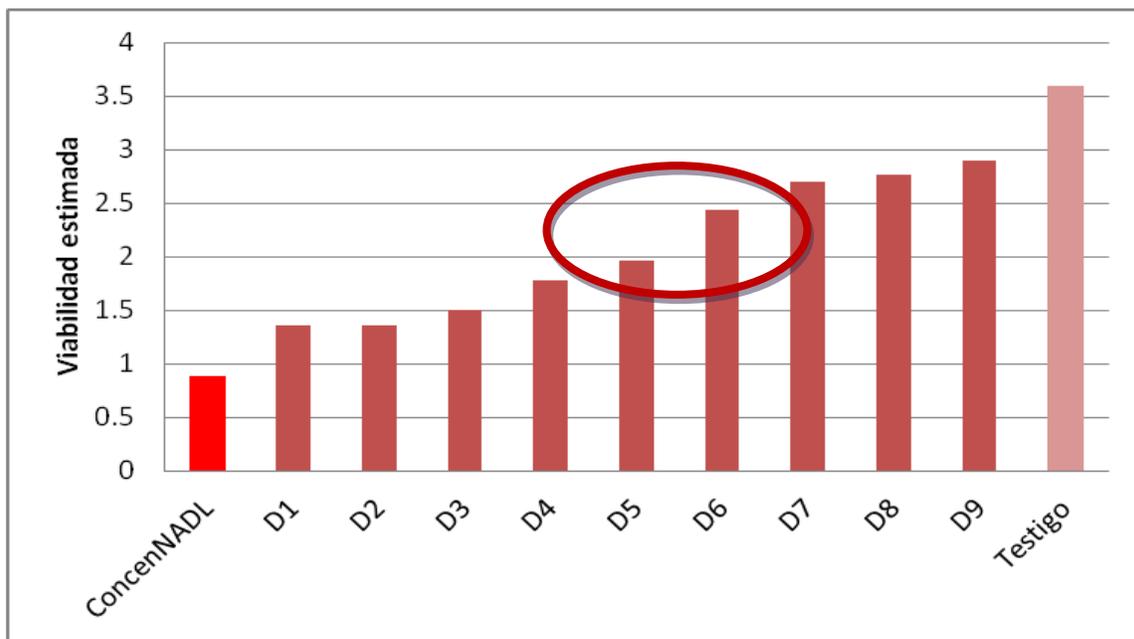


Figura 19. Gráfico de Viabilidad estimada, registrada en los ensayos de viabilidad celular

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

vi.iv Obtención de RNA

Se logró la obtención del RNA a partir de las células infectadas (Figura 21), por el método del trizol, se verificó su integridad y se cuantificó por espectrofotometría, obteniendo concentraciones de 127 ng/ul en promedio, con una pureza promedio 1.8 (260/280)

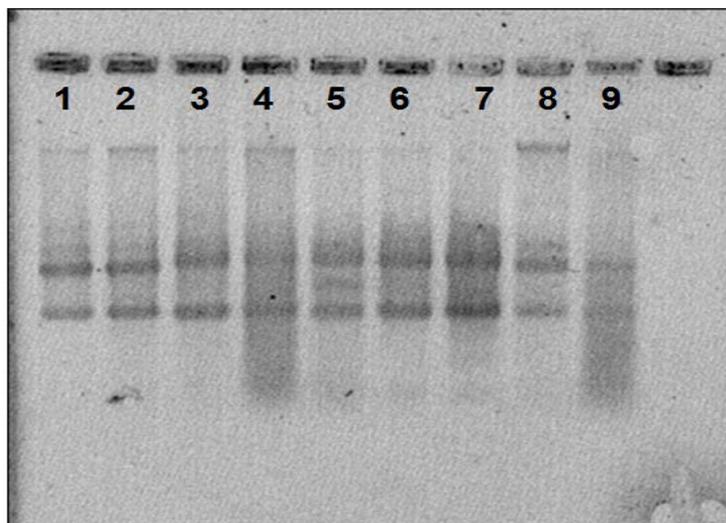


Figura 20. (Gel agarosa al 0.7%, 80 Volts, TBE) Separación mediante electroforesis del RNA obtenido. Carriles 1-9: RNA obtenidos de monocapas de MDBK, infectadas con los virus NADL y SINGER

vi.v Amplificación de productos de PCR de la región UTR 5'

vi.v.i Vacunas

Se amplificaron los productos esperados de 293 pb a partir de RNA obtenido de vacunas comerciales (Figura 22: A, B, C y D) que se adquirieron inicialmente para la estandarización del RT-PCR y posteriormente se amplificaron los fragmentos a partir del RNA de cultivos celulares infectados con cepas de referencia SINGER y NADL. Estos cultivos fueron recuperados a las 48 y 72 horas respectivamente (Figura 22)

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

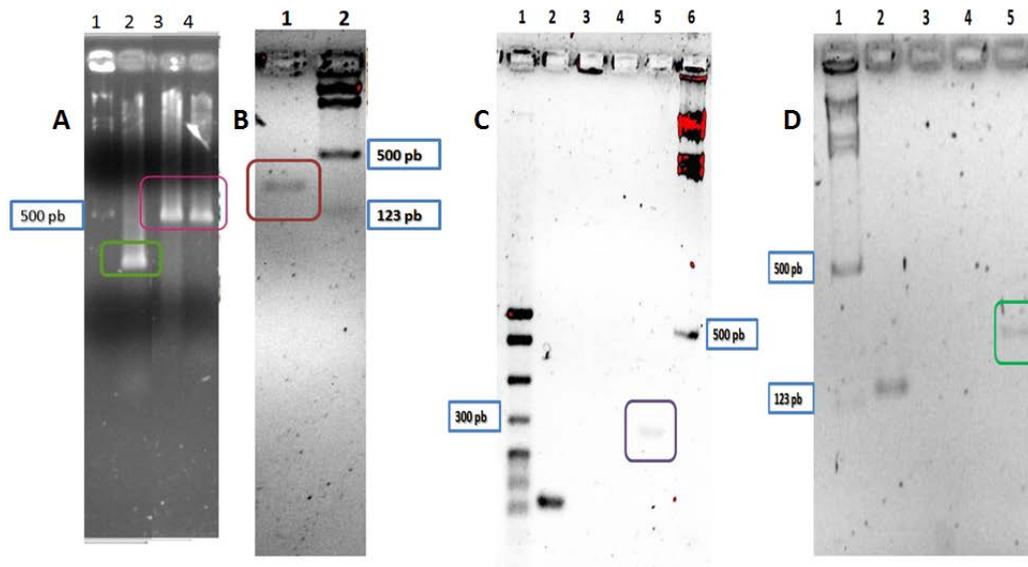


Figura 21. (Geles agarosa al 2%, 80 Volts, TBE). La figura muestra la amplificación de los fragmentos de 293 pb, a partir de las vacunas utilizadas. Separación mediante electroforesis de productos de PCR UTR 5'. A: Vacuna 1: 1. Marcador de 123pb, 2 VDVb, 3 y 4 βactina células MDBK 4. B: Vacuna 2: 1. VDVb, 2. Marcador de 123pb. C: Vacuna 3: 1. Marcador de peso molecular 50 pb, 2. BoHV1, 3 y 4: No se obtuvo amplificación de los virus de BRSV y PI3, en esa vacuna 5. VDVb, 6. Marcador de 123 pb. D. Vacuna 4: 1. Marcador de 123 pb, 3 y 4 No se obtuvo amplificación de los virus de BRSV y PI3, 5. VDVb.

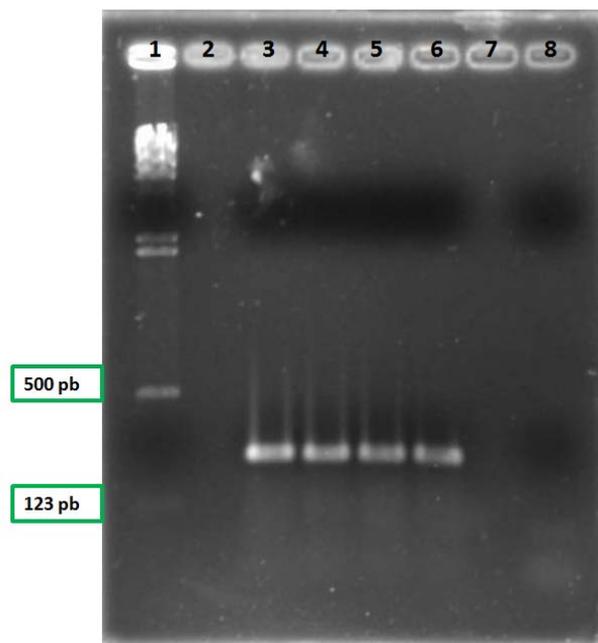


Figura 22. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE). La figura muestra la amplificación de los productos esperados, para los virus de referencia. Separación mediante electroforesis de PCR correspondientes a la UTR 5'. 1: Marcador de 123 pb, 2: Espacio, 3: SINGER 48 hrs en MDBK. 4: NADL 48 hrs en MDBK, 5: SINGER 72 hrs en MDBK, 6: NADL 72 hrs en MDBK 7: Espacio 8: Control sin templado

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

vi.vi Muestras clínicas

vi.vi.i Linfocitos en sangre

Usando linfocitos, que previamente fueron separados de las muestras sanguíneas, de becerros se lograron amplificar los fragmentos esperados de 293 pb a partir del RNA obtenido, de los que, 13 amplificaron para la UTR5' del Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB), siendo éstos más del 60% de los animales muestreados.

Posteriormente, las muestras de oreja de los 13 animales, se utilizaron para el aislamiento viral. Cabe mencionar que a la vez se realizaron RT-PCR y PCR, para otros virus del complejo respiratorio (Herpes virus bovino tipo 1 (BoHV1), Sincitial respiratorio bovino (BRSV) y Virus de parainfluenza bovina tipo 3 (BPIV3)), que son los iniciadores de una patente con número de registro Folio: **MX/E/2012/081438** (Anexo 1, 2 y 3), de los que obtuvimos más del 90% positivos a BHV1, que corresponde a 19 animales (Figura 24) y de los virus restantes, no se obtuvo ninguna amplificación.

Los resultados demuestran un proceso importante de infección entre ambas especies virales y sugiere que existe una asociación entre ellos, deben llevarse a cabo estudios adicionales, para dilucidar cómo éstos virus han sido introducidos en la población bovina local y la posibilidad de que pudieran haberse extendido a otros rebaños o zonas del país.

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

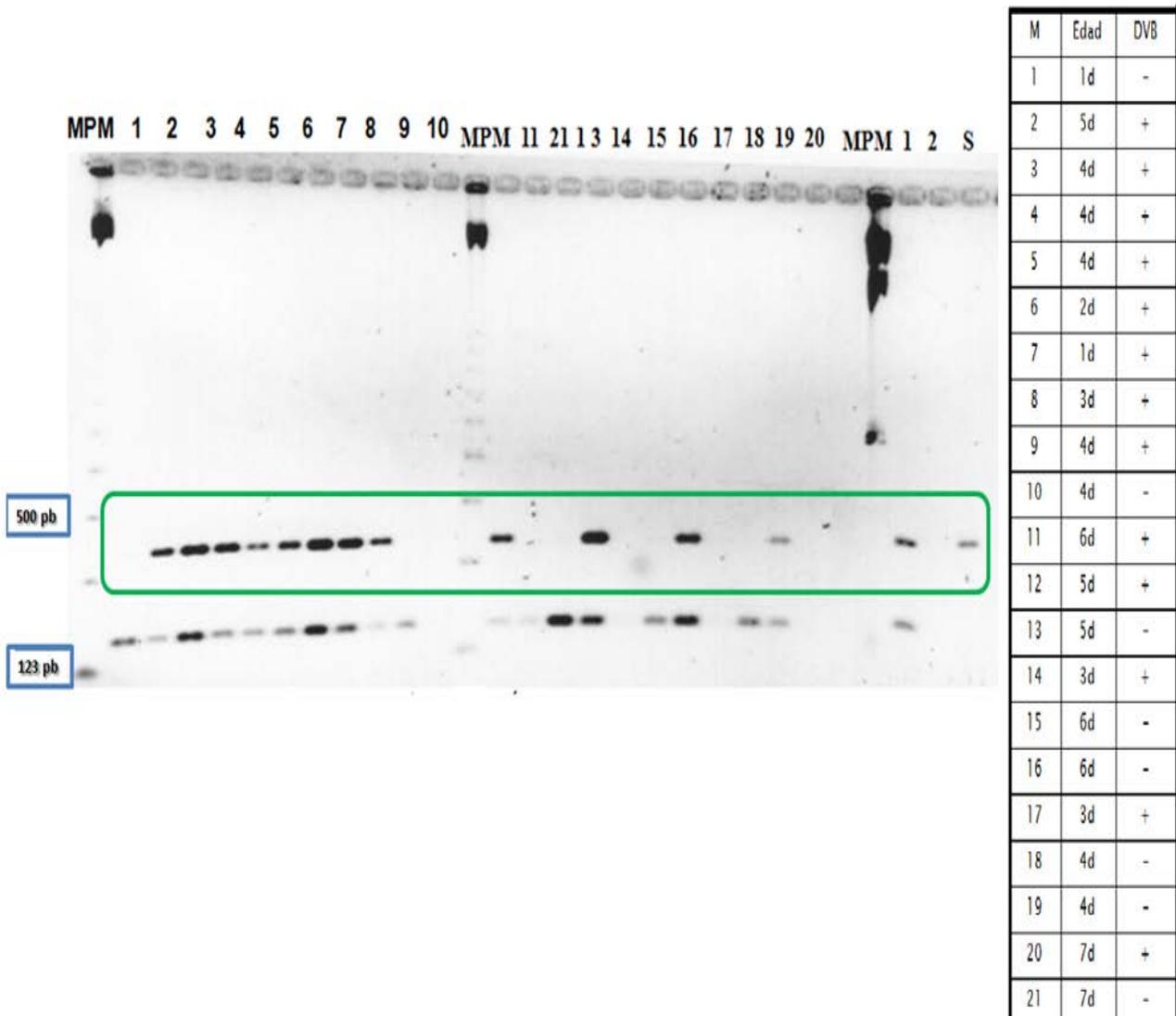


Figura 23. La figura muestra los productos de amplificación para el VDV8 y el BoHV1, además de la edad a la que fueron muestreados los animales, los cuales no fueron vacunados antes del muestreo. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE). Separación mediante electroforesis de los productos de PCR correspondientes a la UTR 5' del múltiplex, banda superior, bandas inferiores fragmentos correspondientes a BoHV1, fragmento de 159 pb. Muestras 1-21, se utilizó como control positivo a la cepa SINGER (S).

vi.vi.ii Lavados de muestras de oreja

Con la finalidad de verificar lo reportado en la literatura, acerca de la posibilidad de realizar la PCR a partir de las células liberadas en lavados de tejidos, se obtuvo el RNA de los lavados con PBS de muestras de oreja y se logró la amplificación de la UTR5', en 18 productos de los cuales, hubo animales que no resultaron positivos en el PCR correspondientes a los linfocitos (Figura 25)

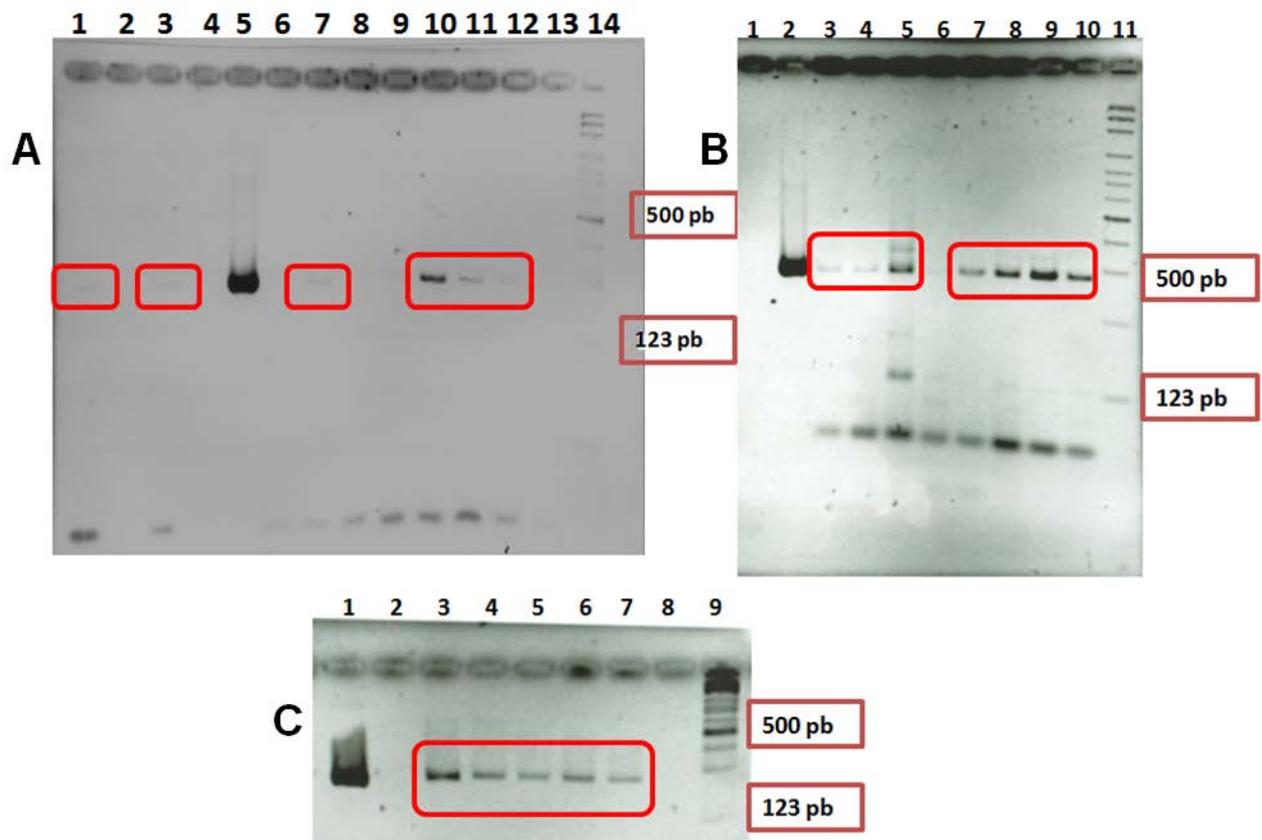


Figura 24. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE) La figura muestra los productos de amplificación obtenidos de lavados con PBS de muestras de oreja de todos los animales muestreados, en el gel B, se observan bandas inferiores que corresponden a iniciadores y productos inespecíficos de amplificación. Separación mediante electroforesis de productos de PCR correspondientes a la UTR 5'. A: 1:18, 2.espacio, 3:19, 4: espacio, 5: Virus de referencia (NADL), 6: Control sin templado, 7-13: 1-7, 14: Marcador de 123pb, B: 1: Control sin templado, 2: NADL, 3-10: 8-15, 11: Marcador 123 pb. C: 1: NADL, 2-7: 16-21, 8: Control sin templado, 9: Marcador de 123 pb

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

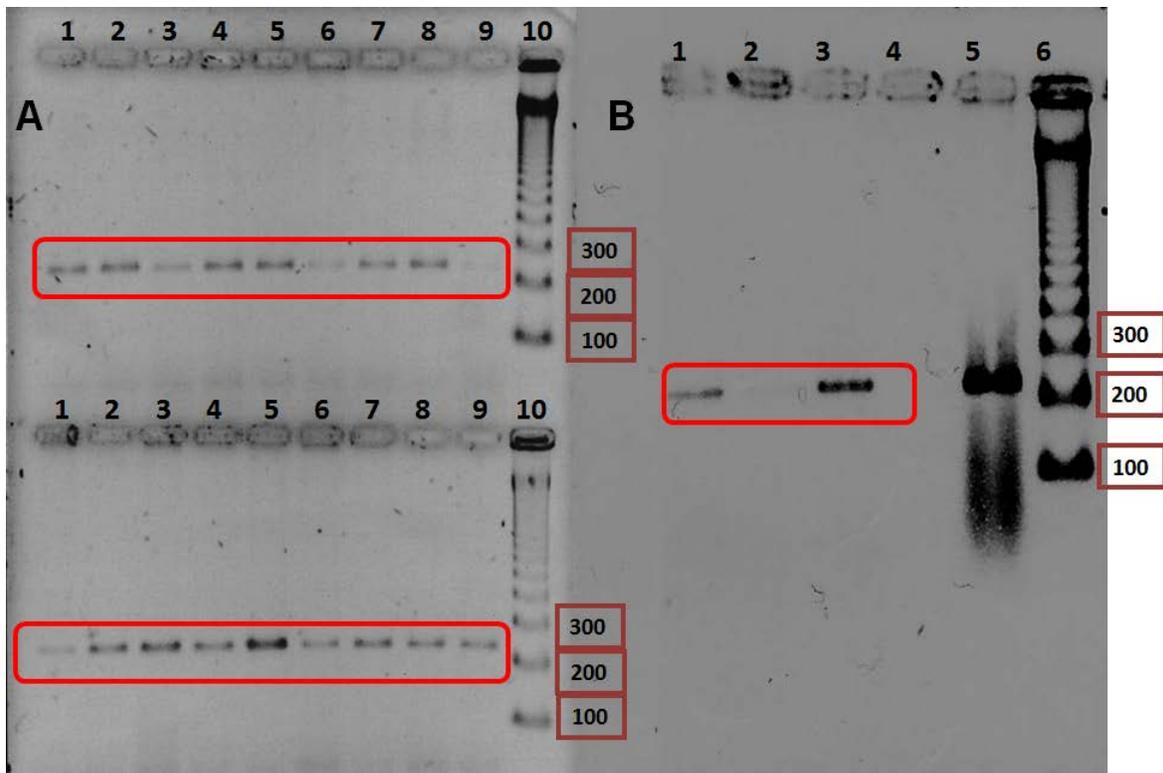


Figura 25. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE). La figura muestra los productos de amplificación obtenidos de muestras de oreja de todos los animales muestreados. Separación mediante electroforesis de productos de PCR correspondientes a la UTR 5'. A: Parte superior: Muestras 1- 9, Marcador de 100pb A: Parte inferior: Muestras 9-18, Marcador de 100pb B: 1-3: Muestras 19-21, 4: Control sin templado, 5: NADL 6: Marcador de 100 pb.

vi.vii Amplificación de productos de PCR de la región Erns-E1 (E0-E1)

vi.viii.i Muestras de oreja

Se logró la amplificación de 12 productos del PCR anidado, correspondientes a la región Erns-E1, se utilizó esta muestra ya que en la UTR 5' amplificó para todos los casos y tener la información del virus original, sin haberlo sujeto al cultivo celular, ya que el virus podría tener mutaciones después de haberse replicado en la línea celular y haciendo posible su clasificación subgenotípica, mediante el análisis de las secuencias, ya que es una de las regiones más variables del genoma viral (Figura 27).

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

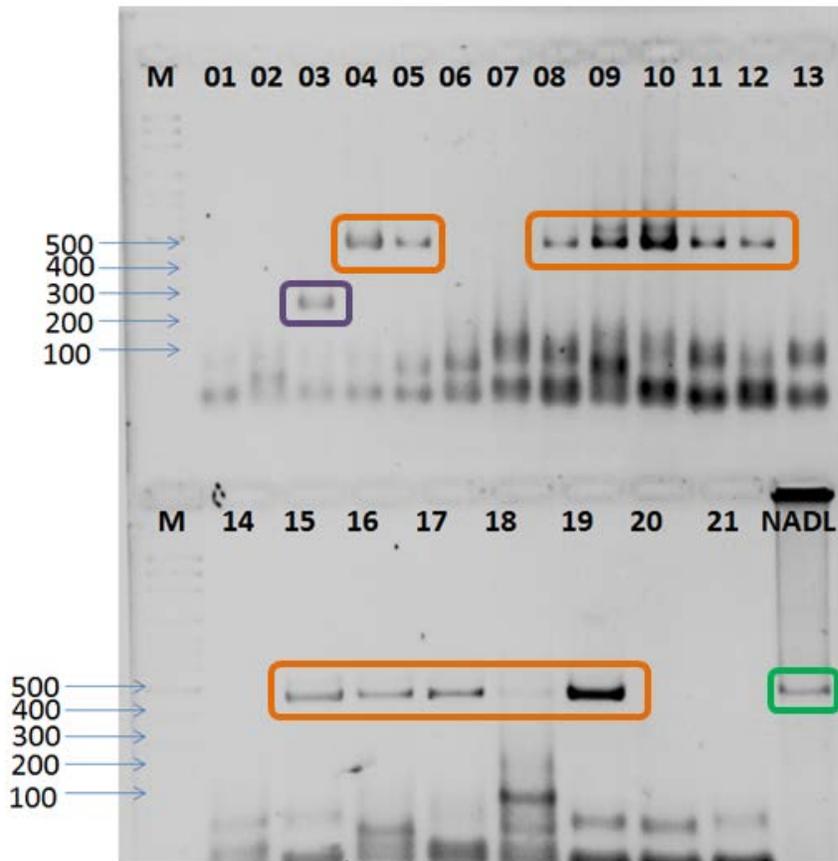


Figura 26. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE). La figura muestra los productos de amplificación obtenidos a partir de RNA de muescas de oreja de todos los animales muestreados. Parte superior: 1: Marcador de 100 pb, 2-13: Muestras 1-13. Parte inferior: 1: Marcador de 100 pb, 2-9: Muestras 14-21. 10: NADL. Se observan bandas inferiores que corresponden a iniciadores y productos inespecíficos. Los productos de PCR corresponden al producto de la PCR anidada de 436pb, la muestra 03 amplificó un fragmento de menor tamaño, 8 muestras no amplificaron, debido a que no fue suficiente el DNA o son virus del genotipo 3, que no se incluyeron en el diseño de los iniciadores.

Con la finalidad de comprobar la presencia del virus, se realizó la prueba de oro en virología y se intentó el aislamiento viral. Para éste fin se realizó co-cultivo de tejido de oreja de las 13 becerras que dieron positivo al RT-PCR de la UTR 5' en linfocitos, con células MDBK y se realizaron 4 pases ciegos seriados, de los que posteriormente se realizó el RT-PCR para la UTR 5'. En el pase 3, se observó efecto citopático semejante al del virus de referencia, en todos los co-cultivos (Ver Figura 28). Sin embargo de los 13 tejidos, se logró la amplificación de 5 fragmentos, que se identifican con las estrellas rojas. Posteriormente se logró una

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

nueva amplificación para las mismas muestras (3, 5, 6, 7 y 8), que fueron sometidas cuarto pase celular, que se muestran en la Figuras 28, 29 y 30.

Se utilizaron como control negativo, pozos sin infectar (C-, Células MDBK). El no tener amplicones para todas las monocapas infectadas, puede implicar que la concentración de virus en la muestra era muy baja, y se perdió la posibilidad de infectar células y por tanto demostrar su presencia, mediante las RT-PCR realizadas.

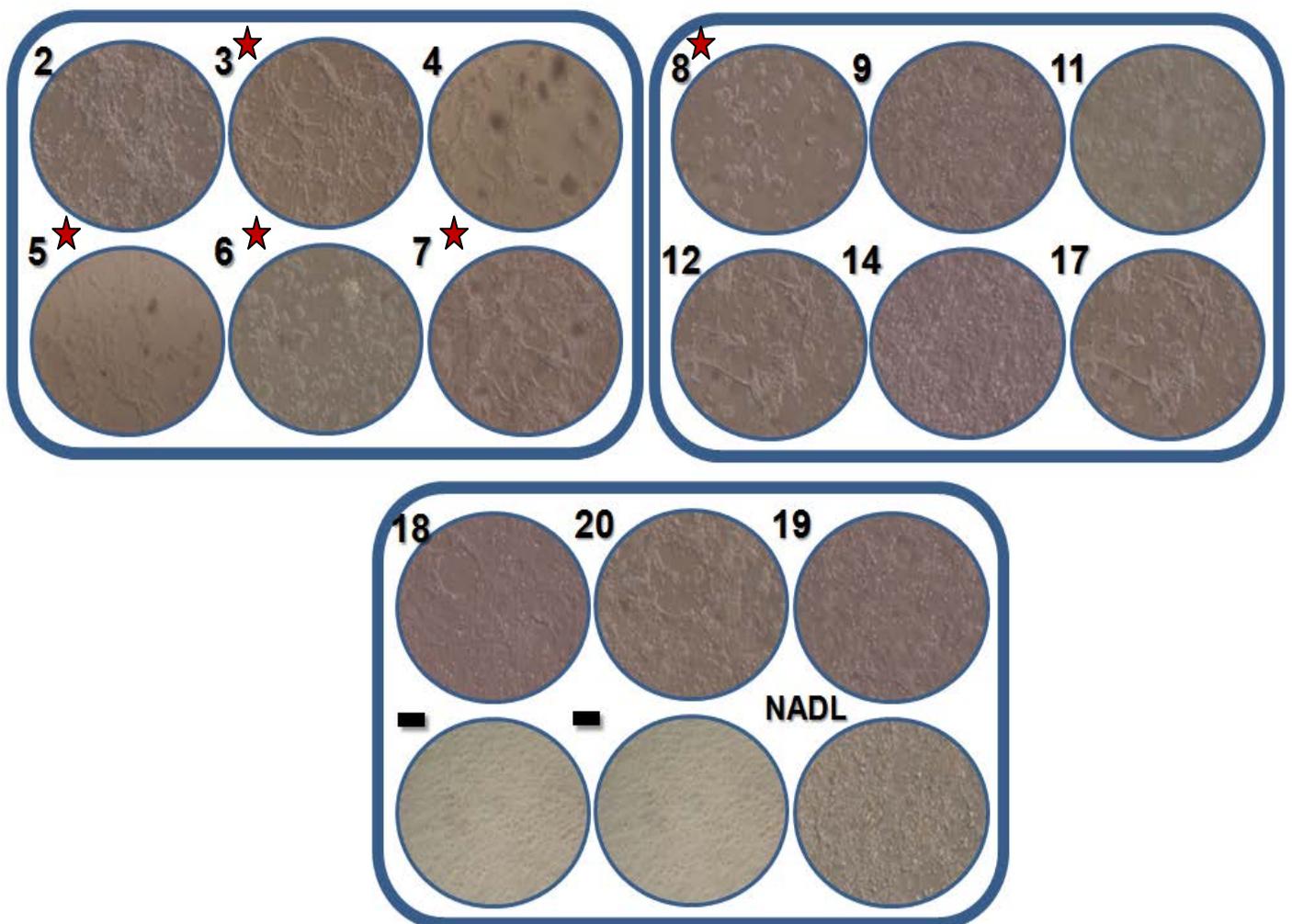


Figura 27. Monocapas de MDBK con efectos citopáticos a las 72 H p.i., en las que se colocaron las muescas de oreja seleccionadas, fueron observadas a 40X en microscopio invertido. La mayoría presentó desprendimiento y lisis celular, en otros casos vacuolización celular, semejante al efecto que produjo el virus de referencia NADL. Las monocapas que resultaron positivas al PCR se identifican con la estrella roja.

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

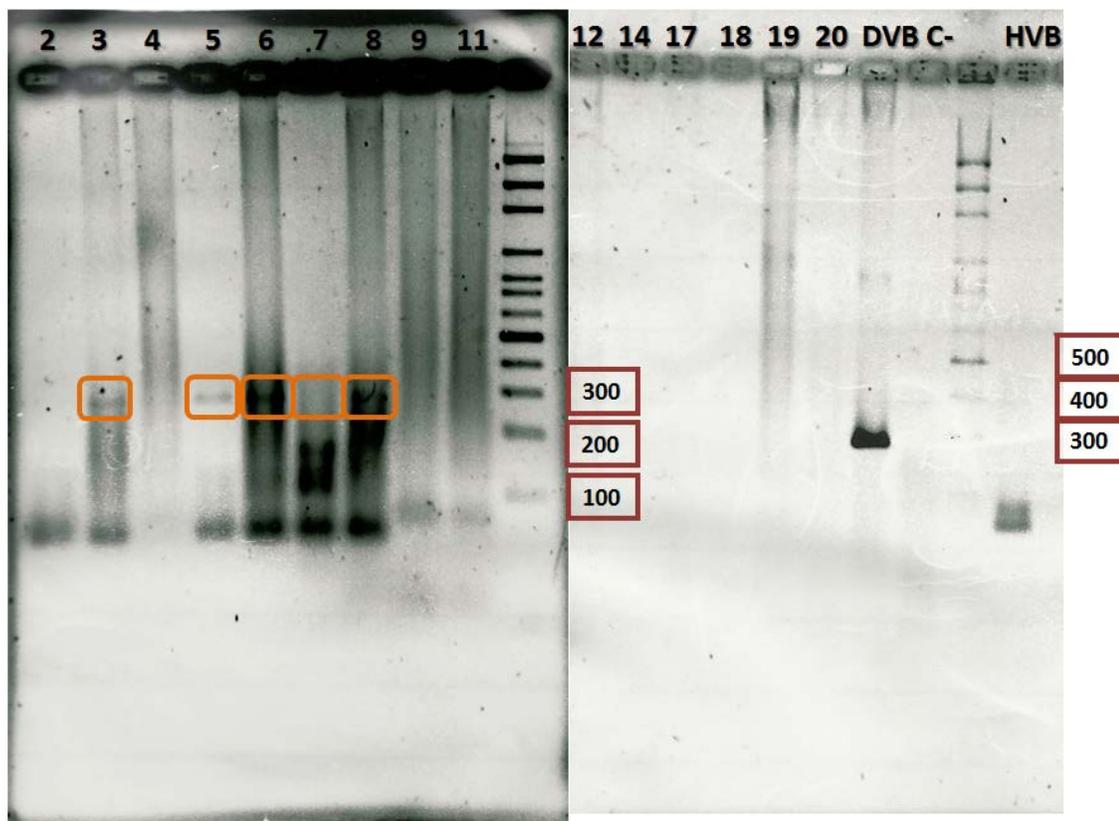


Figura 28. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE) Separación mediante electroforesis de los productos de PCR correspondientes a la UTR 5' de los virus que se logró aislar del pase 3, la figura muestra las muestras que inicialmente resultaron positivas a partir del RNA de las muestras sanguíneas. Gel izquierdo: 1: Muestra 2, 2: Muestra 3, 3: Muestra 4, 4: Muestra 5, 5: Muestra 6, 6: Muestra 7, 7: Muestra 8, 8: Muestra 9, 9: Muestra 11, 10: Marcador de 100 pb. Gel derecho: 1: Muestra 12, 2: Muestra 14, 3: Muestra 17, 4: Muestra 18, 5: Muestra 19, 6: Muestra 20, 7:, 8: NADL, 9: Marcador de 100 pb, 10: Producto de amplificación para Herpes bovino.



Figura 29. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE) Separación mediante electroforesis de los productos de PCR correspondientes a la UTR 5' de los virus que se logró aislar del pase 4. 1: NADL (DVB), 2: Control sin templado, 3: Muestra 03, 4: Muestra 05, 5: Muestra 06, 6: Muestra 07, 7: Muestra 08, 8: Marcador 100 pb.

Se logró calcular el título viral de los 5 virus aislados mediante el método de Reed-Muench, en el que se encontraron títulos bajos de los aislados virales, ver Figura 31, Figura 32 y Figura 33, se resalta en color rojo el punto final del efecto citopático por cada virus.

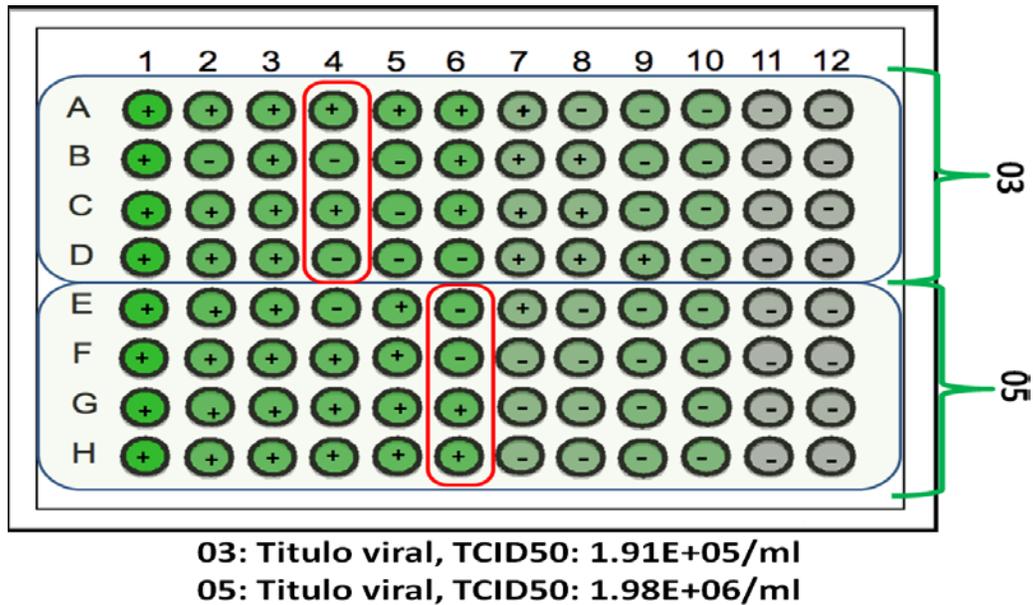


Figura 30. Esquema del efecto citopático registrado en la placa de 96 pozos, para el cálculo del título viral de los aislados 03 y 05

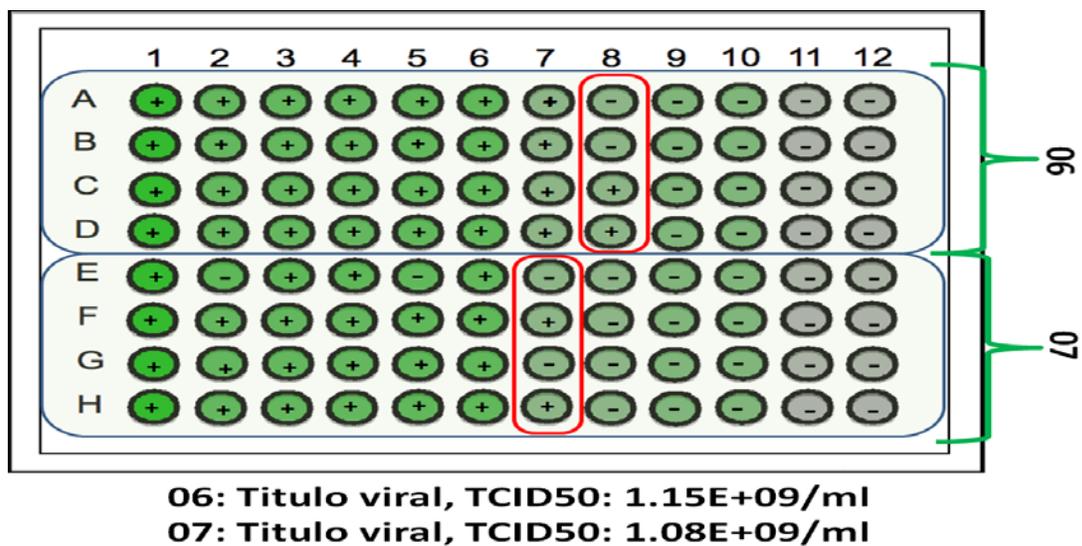


Figura 31. Esquema del efecto citopático registrado en la placa de 96 pozos, para el cálculo del título viral de los aislados 06 y 07

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

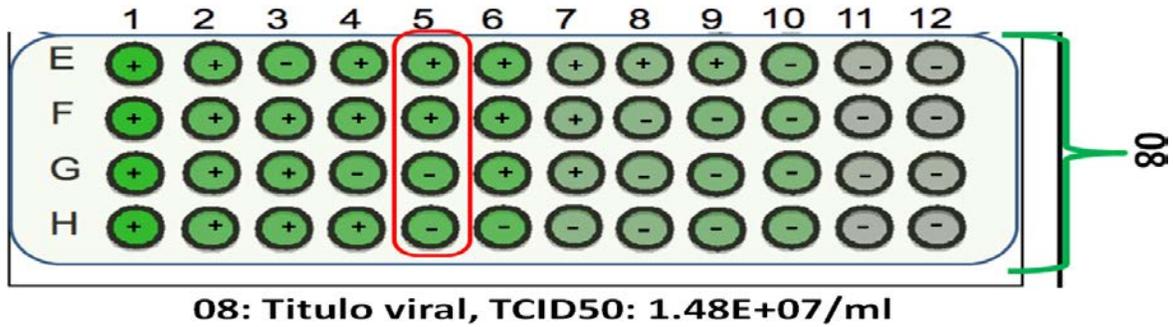


Figura 32. Esquema del efecto citopático registrado en la placa de 96 pozos, para el cálculo del título viral del aislado 08.

vi.x Viabilidad celular de virus aislados en MDBK

El promedio de viabilidad celular de los virus aislados fue del 70% que coincide con el bajo título viral calculado, si consideramos la diferencia en Densidades ópticas (D.O) entre las células testigo y las células infectadas, obtenemos un gráfico de viabilidad estimada. Que fueron comparados con el virus de referencia ya que el ECP no era claro, se observó que el mayor cambio ocurre entre las diluciones 2 y 5, sugiriendo que el umbral de efecto citopático ocurre entre éstas diluciones ver (Figura 34).

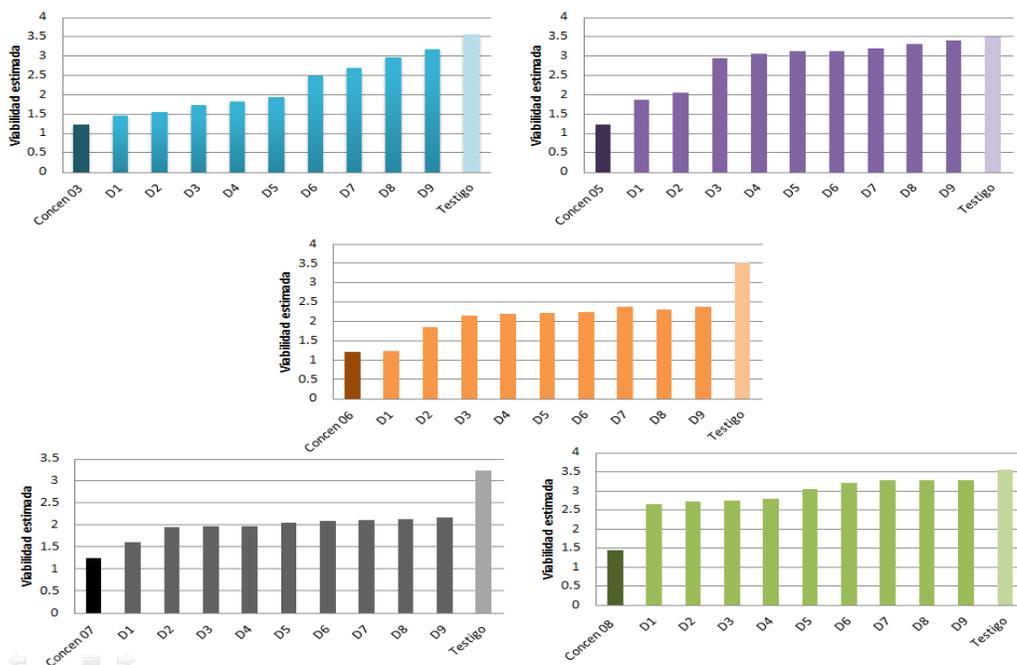


Figura 33. Gráficos de densidades ópticas registradas en los ensayos de viabilidad celular para los virus aislados, encontrando que las señales más altas emitidas por el colorante correlacionan con un alto porcentaje de viabilidad celular debido al bajo título

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

vi.xi Purificación de fragmentos de PCR

Se logró la purificación de todos los productos de PCR correspondientes a la región UTR5' y sólo 12 para los fragmentos de la PCR anidada E0-E1, para realizar el análisis de secuencias ver Figuras 35 y 36.

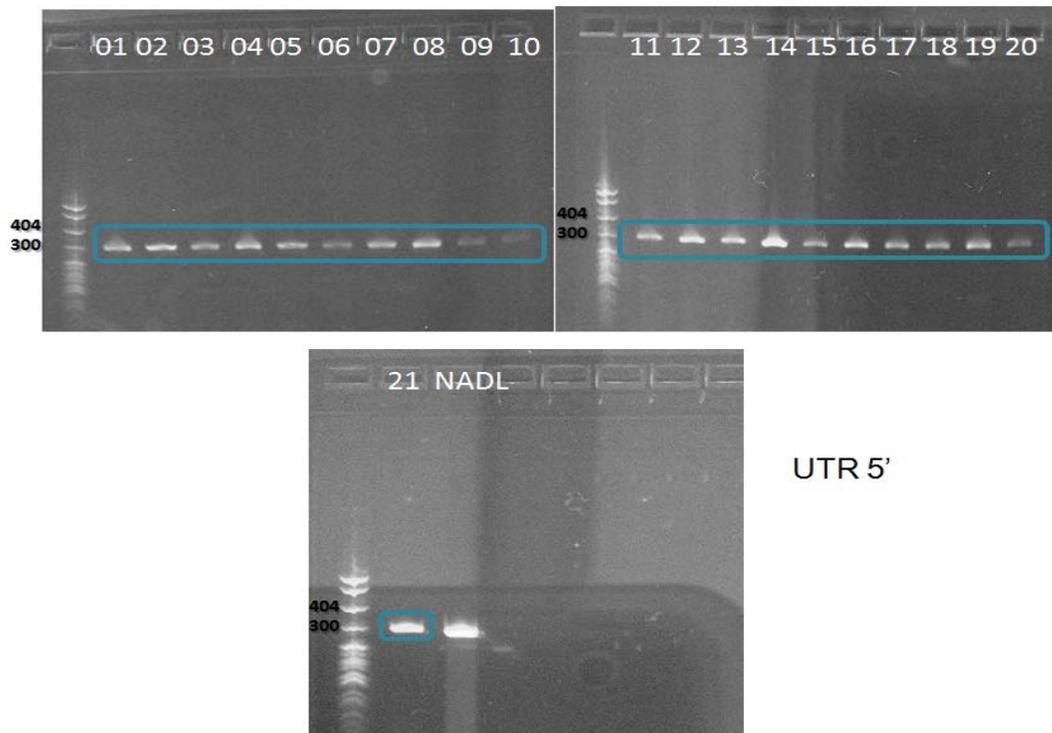


Figura 34. (E-Gel agarosa al 2%, TBE) Separación mediante electroforesis de productos de PCR purificados, correspondientes a la UTR 5' de muescas de oreja. Superior izquierda 1: Marcador de 123 pb, 2-10: Muestras 01-10, Superior derecha 1: Marcador de 123 pb, 2-10: Muestras 11-20, Inferior 1: Marcador de 123 pb, 2: Muestra 21, 3: NADL

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

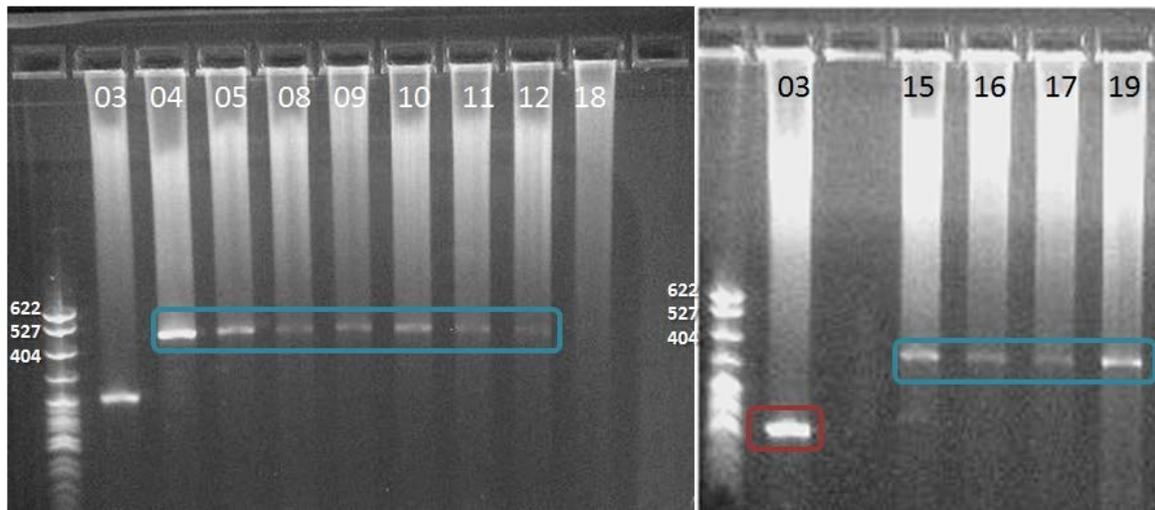


Figura 35. (E-Gel agarosa al 2%, TBE) Separación mediante electroforesis de productos de PCR purificados, correspondientes a la Erns-E1 anidada a partir de muestras de oreja. Izquierdo 1: Marcador de 123, 2: Muestra 03, 3: Muestra 04, 4: Muestra 05, 5: Muestra 08, 6: Muestra 09, 7: Muestra 10, 8: Muestra 12, 9: Muestra 18. Derecho 1: Marcador de 123 pb, 2: Muestra 03, 3: Espacio, 4: Muestra 15, 5: Muestra 16, 6: Muestra 17, 7: Muestra 19.

vi.xii Análisis de secuencias y construcción del árbol filogenético

Se analizaron los electroferogramas entregados, de 12 muestras de las 21 muestras totales, a partir de los productos de PCR de la UTR 5'. Encontrando que los virus en estudio pertenecen al genotipo 1, que se muestra en la figura 37, se resalta en color rosa las secuencias obtenidas y en rojo la caja al genotipo al que corresponden (Muestras 01, 02, 03, 04, 05, 07, 08, 09, 10, 12, 14 y 15) y las cajas restantes corresponden a los virus del genotipo 2 y 3.

Respecto a la región variable Erns-E1 no fue posible realizar el análisis ya que las secuencias son de muy baja calidad y no se lograron agrupar en un subgenotipo determinado. Los resultados generales de los RT-PCR y las PCR anidadas realizados se muestran en la tabla 9, en el que también se incluye, la edad de los animales del estudio y el tipo de muestra utilizada para ello.

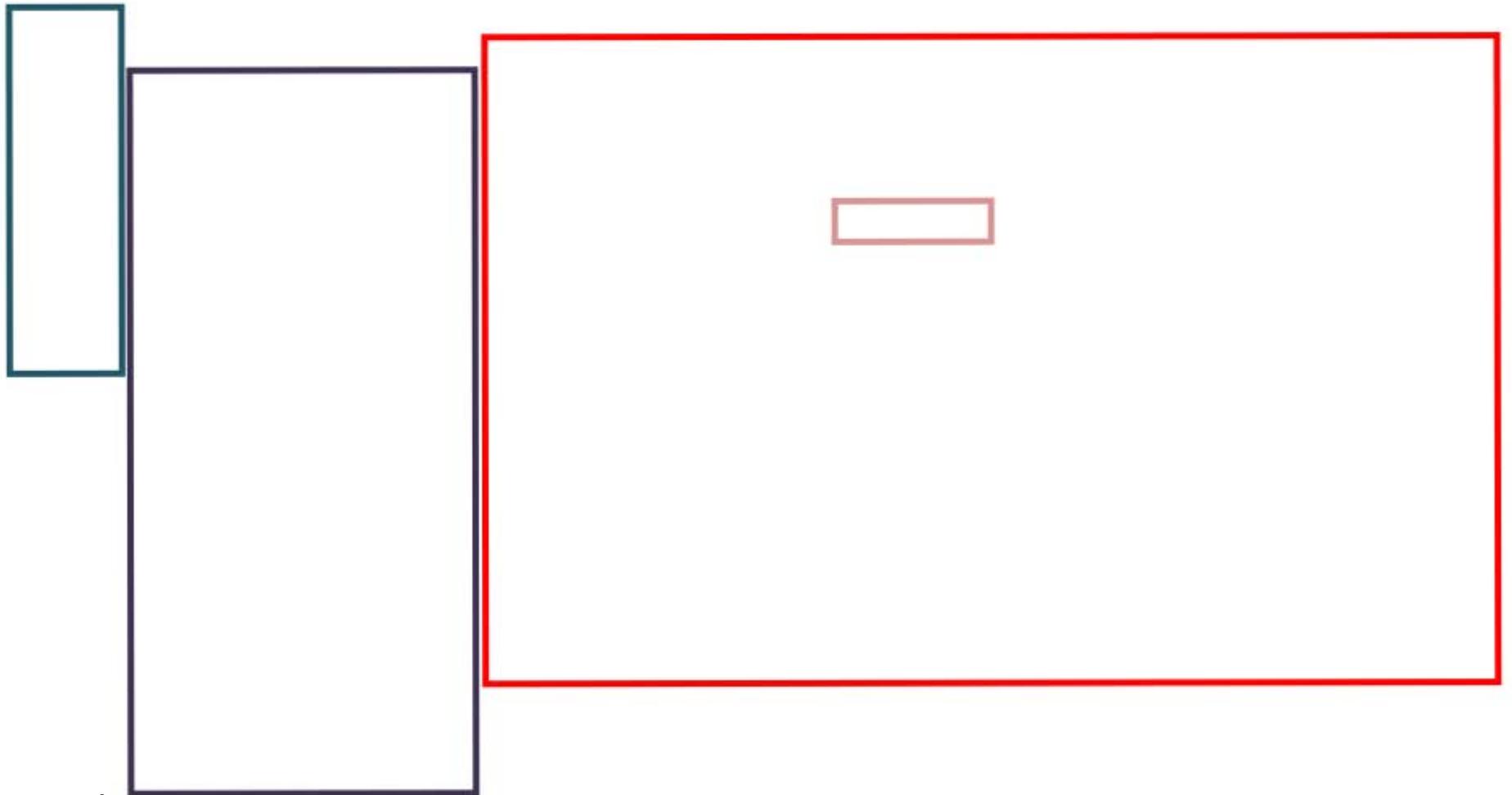


Figura 36. Árbol filogenético de UTR 5' construido en MEGA 5

No. Muestra	No. Identif	Fecha Nac	Genero	Establo	Edad	Leucocitos en Sangre				Muesca de oreja			Aislamiento viral	
						RT-PCR PI3	RT-PCR BR5V	PCR HVB1	RT-PCR DVB UTR5'	RT-PCR UTR5'	RT-PCR Nested Ems-E1	Genotipo UTR5'	ECP 72H p.i.	RT-PCR UTR5'
1	30	23/03/2011	Hembra	106	1d	-	-	+	-	+	-	Genotipo I	-	-
2	26	19/03/2011	Hembra	106	5d	-	-	+	+	+	-	Genotipo I	+	-
3	27	20/03/2011	Hembra	106	4d	-	-	+	+	+	+	Genotipo I	+	+
4	28	20/03/2011	Hembra	106	4d	-	-	+	+	+	+	Genotipo I	+	-
5	29	20/03/2011	Hembra	106	4d	-	-	+	+	+	+	Genotipo I	+	+
6	22(madre)	22/03/2011	Hembra	182	2d	-	-	+	+	+	-	No determinado	+	+
7	7	23/03/2011	Hembra	182	1d	-	-	+	+	+	-	Genotipo I	+	+
8	8	21/03/2011	Hembra	167	3d	-	-	+	+	+	+	Genotipo I	+	+
9	9	20/03/2011	Hembra	167	4d	-	-	+	+	+	+	Genotipo I	+	-
10	10	20/03/2011	Hembra	167	4d	-	-	+	-	+	+	Genotipo I	-	-
11	11	18/03/2011	Hembra	200	6d	-	-	+	+	+	+	No determinado	+	-
12	12	19/03/2011	Hembra	200	5d	-	-	+	+	+	+	Genotipo I	+	-
13	13	19/03/2011	Hembra	200	5d	-	-	+	-	+	-	No determinado	-	-
14	14	21/03/2011	Hembra	200	3d	-	-	+	+	+	-	Genotipo I	+	-
15	15	10/03/2011	Hembra	193	6d	-	-	-	-	+	+	Genotipo I	-	-
16	16	18/03/2011	Hembra	193	6d	-	-	+	-	+	+	No determinado	-	-
17	17	21/03/2011	Hembra	176	3d	-	-	+	+	+	+	No determinado	+	-
18	18	20/03/2011	Hembra	176	4d	-	-	-	-	+	+	No determinado	-	-
19	19	20/03/2011	Hembra	176	4d	-	-	+	-	+	+	No determinado	-	-
20	20	17/03/2011	Hembra	175	7d	-	-	+	+	+	-	No determinado	+	-
21	21	17/03/2011	Hembra	175	7d	-	-	+	-	+	-	No determinado	-	-

Tabla 9. Resultados generales de los RT-PCR y PCR anidadas, genotipo en el que se agruparon las secuencias analizadas. Se muestra además el resultado de otros virus del complejo respiratorio, que fueron probados y el aislamiento viral.

VII. Discusión y conclusión

La técnica de RT-PCR de la región UTR 5' resultó ser una técnica reproducible y útil para el diagnóstico del virus de la diarrea viral bovina, ya que se obtuvieron resultados de amplificación con diversos tipos de productos biológicos, obtenidos de muestras clínicas. Del mismo modo resultó ser útil para el control de calidad en los biológicos tanto en vacunas como suplementos usados en cultivo celular (Sueros fetales bovinos comerciales), en el sentido de poder verificar la presencia e identidad de los virus que se refieren contenidos en éstos productos. Polak y colaboradores (2008), reportaron que diversos lotes y marcas comerciales de sueros bovinos empleados para el cultivo celular, han sido positivos a VDVB mediante el uso de la RT-PCR, amplificando la UTR 5' y la región que codifica para la polimerasa viral (NS5B) para su identificación. La contaminación de éstos productos puede dificultar el diagnóstico, presentando falsos positivos en el aislamiento viral y alterar la identidad de los productos biológicos con fines de inmunización del ganado bovino y de otras especies animales susceptibles a la infección por este virus. Studer y colaboradores en 2002, demostraron que incluso en vacunas de uso humano el VDVB está presente como contaminante, acarreado en los sueros bovinos empleados para éste fin y que no parece ser un motivo de preocupación inmediata para la salud humana ya que el virus no se ha podido replicar en células humanas, sin embargo altera la composición de los biológicos.

Los resultados obtenidos sugieren que el virus de la diarrea viral bovina puede estar presente en un alto porcentaje en las poblaciones bovinas ya que se determinó un 60% de positivos en las muestras sanguíneas y el 100% en las muescas de oreja, mediante la técnica de RT-PCR. Walz y colaboradores en 2010, estimaron que en Norteamérica se tienen tasas de prevalencia de VDVB que oscila entre el 28 a 53% y de entre 0,1 y 0,4% de animales PI, confirmando en buena medida los resultados obtenidos en este estudio.

Por otro lado, la detección del genoma viral del VDVB, en las muescas de oreja propone que los animales muestreados son persistentemente infectados, pues no

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

habían sido sometidos a vacunación y acorde con Webb (2012), cuando se produce una viremia en el primer trimestre de gestación, se establece la persistencia viral y a lo largo del desarrollo embrionario de éstos animales, el virus puede estar presente en diversos sistemas y órganos, facilitando la detección del virus en diversos productos biológicos como piel y fluidos. No obstante, no fue posible detectarlo en todas las muestras sanguíneas, posiblemente atribuido a que el virus tiene la capacidad de inducir leucopenia, disminuyendo la cantidad de linfocitos en sangre que dificultó la obtención del material genético y no fuera detectable el genoma mediante la RT-PCR (Sarikaya *et al.*, 2011).

Con respecto a la amplificación de la región variable (Erns-E1), en la que se utilizó una RT-PCR y PCR anidada, se logró la amplificación de 12 fragmentos con la longitud esperada, sin embargo en la muestra 03 se obtuvo un fragmento de menor tamaño, debido posiblemente a una inespecificidad o una delección que produjo un virus defectuoso, que se podría corroborar mediante secuenciación, Kupfermann y colaboradores (1996), reportaron el aislamiento de virus defectuosos, con delecciones en diversas regiones del genoma que codifican tanto para proteínas estructurales como no estructurales y describen delecciones que van desde 1,611 hasta 3,102 nucleótidos.

Por otro lado en la PCR anidada hubo muestras en las que no se tuvo éxito en la amplificación ya que los oligonucleótidos diseñados para ésta región del genoma pudieron no incluir secuencias de posibles variantes virales o la posible inhibición de las reacciones de PCR por características inherentes a la muestra (Roux, 2009).

El aislamiento de 5 virus mediante los co-cultivos, harán posible conocer las características antigénicas de éstos virus, para proponer el desarrollo de vacunas endémicas o locales ya que, como se ha venido refiriendo por diversos autores, existe heterogeneidad antigénica, determinada en estudios de neutralización cruzada, en los que se observó una gran diferencia en títulos de anticuerpos entre

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

los diferentes subgenotipos. Esta heterogeneidad obstaculiza el uso de las vacunas que ya se tienen disponibles e indica que la protección de las vacunas se puede optimizar utilizando cepas prevalentes del VDVB para una región determinada y aproximarse a disminuir el impacto que tiene ésta especie viral en la producción bovina (Escamilla *et al.*, 2007; Bachofen *et al.*, 2010).

El no tener amplicones en el aislamiento viral en los co-cultivos, podría implicar que la concentración de virus en la muestra fue muy baja y se perdió la posibilidad de que el virus infectara las células y por tanto obtener un resultado negativo en las RT-PCR (Crespo, 2000).

Con los resultados en el análisis filogenético y la construcción de árboles con base a secuencias reportadas para la especie viral, se logró construir un árbol para la región UTR 5', en el que se agruparon las secuencias en estudio con el genotipo I (Figura 37). La obtención de secuencias de buena calidad, aumentando la concentración de DNA mediante la clonación de los fragmentos obtenidos y su purificación, evitaría el sesgo en los análisis de secuenciación y podría dar información suficiente para conocer las variantes virales, como lo descrito por Giangaspero y colaboradores (2008), en un estudio en el que utilizan un método simple de genotipificación, denominado "The palindromic nucleotide substitutions" (PNS) que consiste en un software disponible en línea (<http://www.pns-software.com/>) en el que se puede predecir la estructura secundaria de la región UTR 5', prevé su plegamiento en estructuras palindrómicas de tallo bucle que representan regiones críticas del genoma viral, que son responsables de la traducción, la transcripción y la replicación en los pestivirus. Giangaspero y colaboradores, (2013) asociaron ciertas sustituciones PNS, como marcadores característicos para cada uno de los genotipos y subgenotipos de las especies pestivirales.

Como perspectivas de este trabajo, se propone un nuevo diseño de iniciadores, que flanqueen otras regiones del genoma viral que codifican para las proteínas de

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

superficie, como lo son Erns, E1 y E2, incluyan la amplia diversidad de subgenotipos reportados en América, así como la secuenciación del genoma viral completo, para realizar una mejor comparación y clasificación de los virus de campo aislados, además conocer sus características antigénicas y determinar las variantes que circulan en México con la finalidad de aproximarnos a establecer un diagnóstico adecuado en la identificación de esta especie viral. En la literatura diversos autores como los grupos de trabajo de Schirrmeyer (2004), Behera (2010) y Pogranichniy (2011), coinciden en que la diferencia antigénica y la presencia de animales PI, dificulta el control y erradicación de los virus de la diarrea viral bovina. Sin embargo el uso de técnicas de diagnóstico por inmunoensayos combinado con las tecnologías moleculares como la PCR, para la confirmación de la enfermedad, serán esenciales en la elaboración de nuevos estudios epidemiológicos coadyuvando en el desarrollo de estrategias efectivas, como la creación de nuevos programas de vacunación y eliminación de animales PI, apegados a la problemática real de diversas regiones del país en las que existen producciones bovinas, ya que los programas de vacunación disponibles no han tenido resultados satisfactorios (Sarıkaya *et al.*, 2012).

Éste trabajo es el primero en México en reportar secuencias de virus, presentes en bovinos de hatos lecheros y deja vislumbrar que es de relevancia el conocimiento de la problemática actual del país, además sugiere posible, que estos virus presentes en los establos muestreados de la Cuenca lechera de Tizayuca, estén asociados a persistencia viral, debido a que en las muescas de oreja utilizadas se lograran aislamientos virales. Sería inabordable realizar este tipo de diagnóstico de manera individual en las producciones bovinas, ya que estima que existen en el país alrededor de 32 millones de cabezas de ganado, sin embargo existe la posibilidad de realizar muestreos globales en los que se incluyan mezclas de muestras de piel de los animales, de manera aleatorizada y por grupos de edad para tener un panorama general de la salud de los hatos en las producciones bovinas (Walz *et al.*, 2010).

VIII. Literatura citada

1. Adler, Heiko; Jungi, Thomas W.; Pfister, Hedi; Strasser, Marc; Sileghem, Maarten; Peterhans, Ernst. Cytokine Regulation by Virus Infection: Bovine Viral Diarrhea Virus, a Flavivirus, Downregulates Production of Tumor Necrosis Factor Alpha in Macrophages In Vitro. *Journal of Virology*, p. 2650–2653. 1996.
2. Adler, Barbara; Adler, Heiko; Pfister, Hedi; Jungi, Thomas W.; Peterhans, Ernst. Macrophages Infected with Cytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Release a Factor(s) Capable of Priming Uninfected Macrophages for Activation-Induced Apoptosis. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 3255–3258. 1997
3. Agapov, E. V.; Murray, C. L.; Frolov, H.; Qu, L., Myers; T. M., Rice, C. M.; Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhea virus. *Journal of Virology* 78: 2414-2425. 2004.
4. Agnello, V.; Ábel, G.; Elfahal, M.; Knight, G. B.; Zhang, Q.-X.. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low-density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS)* 96: 12766-12771. 1999.
5. Alkheraif, M., Abdulrahman Abdulaziz. Influence of type 2 bovine viral diarrhea virus Npro on enhancement of bovine respiratory syncytial virus replication mediated by antagonism of host cell interferon type I responses. Thesis of Master of Science. DigitalCommons@University of Nebraska - Lincoln. 2010.
6. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Meyers, E. W.; Lipman, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3), 403-410. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). 1990
7. Ammari, Mais; McCarthy, Fiona; Nanduri, Bindu M. Analysis of Bovine Viral Diarrhea Viruses-infected monocytes: identification of cytopathic and noncytopathic biotype differences. *BMC Bioinformatics*, 11(Suppl 6):S9. 2010
8. Ammari, Mais; McCarthy, Fiona; Nanduri, Bindu; Pinchuk, Pinchuk, George; Understanding the Pathogenesis of Cytopathic and Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Infection Using Proteomics. *Proteomic Applications in Biology*. Chapter 3. Ed. InTech. p 53-64. 2012

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

9. Ansari, I. H., Chen, L. M., Liang, D., Gil, L. H., Zhong, W., Donis, R. O. Involvement of bovine viral diarrhoea virus NS5B locus in virion assembly. *Journal of Virology* 78: 9612-9623. 2004.
10. Ávalos-Ramírez, R. M.; Orlich, H.J; Thiel, y Becher, P. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology*, 286(2): p. 456-65. 2001
11. Avila-García, Jorge; Cruz-Hernández, Georgina. ALTERNATIVAS DE VACUNACIÓN DEL GANADO EN EL TRÓPICO. <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/bovinotecnia/BtR GClig0020.pdf>. 2011
12. Bachofen, Claudia; Braun, Ueli; Hilbe, Monika; Ehrensperger, Felix; Stalder, Hanspeter; Peterhans, Ernst. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Veterinary Microbiology* 141, 258–267. 2010
13. Bachofen, Claudia; Stalder, Hanspeter; Braun, Ueli; Hilbe, Monika; Felix, Ehrensperger; Peterhans, Ernst. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Veterinary Microbiology* 131, 93–102. 2008
14. Bálint, Ádám. Molecular characterisation of bovine viral diarrhoea virus with special regard to cytopathogenicity. Doctoral Thesis. Szent István University, postgraduate school of veterinary science. Budapest. 2005
15. Bálint, Ádám; Baule, Claudia; Pálfi, Vilmos; Belák, Sándor. Retrospective genome analysis of a live vaccine strain of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Res.* 36 89–99. 2005.
16. Bassett, Suzanne E.; Thomas, David L.; Brasky, Kathleen M.; Lanford, Robert E. Viral Persistence, Antibody to E1 and E2, and Hypervariable Region 1 Sequence Stability in Hepatitis C Virus-Inoculated Chimpanzees. *Journal of virology*, Vol. 73, No. 2 p. 1118–1126. 1999.
17. Becher, P., Orlich, M.; Kosmidou, A.; König, M.; Baroth, M.; Thiel, H.J. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, 262(1): p. 64-71. 1999
18. Becher, Paul; Orlich, Michaela; Thiel, Heinz-Jürgen. Mutations in the 5' Nontranslated Region of Bovine Viral Diarrhoea Virus Result in Altered Growth Characteristics. *Journal of virology*, Vol. 74, No. 17, p. 7884–7894. 2000.

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

19. Beer, Martin; Reimann, Llona; Hoffmann, Bernd; Depner, Klaus. Novel marker vaccines against classical swine fever. *Vaccine* 25, 5665–5670. 2007
20. Behera, Sthita Pragnya; Mishraa, Niranjana, Vilcek, Stefan; Rajukumara, Katherukamem; Nema, Ram Kumar; Prakash, Anil; Kalaiyarasua, S.; Dubeya, Shiv Chandra. Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolated from cattle in India. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* Mar; 34(2):189-96. 2010.
21. Behrens, Sven-Erik; Grassmann, Claus W.; Thiel, Heinz-Jürgen; Meyers, Gregor; Tautz, Norbert. Characterization of an Autonomous Subgenomic Pestivirus RNA Replicon. *Journal of virology*, Vol. 72, No. 3, p. 2364–2372. 1998.
22. Benson D. A., Karshc-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Wheeler D. L. GenBank. *Nucleic Acids Research* 33, 34-38. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). 2005
23. Bielefeldt-Ohmann, H.; Ronsholt, L.; Bloch, I. Demonstration of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Persistently Infected, Clinically Normal Cattle. *J. gen. Virol.*, 68, 1971-1982. 1987
24. Bolin, S. R.; Ridpath, J. F.; Black, J.; Macy, M.; Roblin, R. Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods* 48: 211-221. 1994.
25. Bolin, Steven R.; Ridpath, Julia F. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *J Vet Diagn Invest* 10:135–139.1998
26. Borowski, P; Niebuhr, A; Schmitz, H; Hosmane, RS; Bretner, M; Siwecka, MA; Kulikowski; T. NTPase/helicase of Flaviviridae: inhibitors and inhibition of the enzyme. *Acta Biochimica Polonica*; 49(3):597-614. 2002
27. Botton, S.A.; da-Silva, A.M.; Brum, M.C.; Weiblen, S. R.; Flores, E.F. Antigenic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by monoclonal antibodies and cross-neutralization. *Brazilian journal of medical and biological research.* 31: 1429-1438.1998
28. Burrack, Sandra; Aberle, Daniel; Bürck, Jochen; Ulrich, Anne S.; Meyers, Gregor. A new type of intracellular retention signal identified in a pestivirus structural glycoprotein. *The FASEB Journal* article fj.12-207191. 2012

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

29. Brackenbury LS, Carr BV, Charleston B. Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with VDVB. *Veterinary Microbiology* 96: 337-344. 2003
30. Brusckke, Christianne J. M.; Hulst, Marcel M.; Moormann, Rob J. M.; Van rijn, Piet A.; Van Oirschot, Jan T. Glycoprotein Erns of Pestiviruses Induces Apoptosis in Lymphocytes of Several Species. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 6692–6696. 1997
31. Casaubon, Julien, Vogt, Hans-Rudolf; Stalder, Hanspeter; Hug, Corinne; Ryser-Degiorgis, Marie-Pierre. Bovine viral diarrhea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. *BMC Veterinary Research*, 8:204. 2012
32. Cattaneo, Roberto. Four Viruses, Two Bacteria, and One Receptor: Membrane Cofactor Protein (CD46) as Pathogens' Magnet. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 4385–4388. 2004
33. Celedón, M O; Osorio, J; Pizarro, J. Aislamiento e identificación de pestivirus obtenidos de alpacas (*Lama pacos*) y llamas (*Lama glama*) de la Región Metropolitana, Chile. *Arch. Med. Vet.* 38, N° 3, 1-6. 2006
34. Chase, Christopher. The impact of VDVB infection on adaptive immunity. *Biologicals*. 41(1):52-60. 2013
35. Chase, CCL; Braun, LJ; Holler, L. Characterization of Bovine Viral Diarrhea Virus (VDVB) Genetics, Antibody Response and Viremia from a Group of VDVB Persistently Infected Calves. *The American Association of Bovine Practitioners*. 38:207, 2005
36. Christmas, Stephen E.; de la Mata-Espinosa, Claudia T.; Halliday, Deborah; Buxton, Cheryl A.; Cummerson, Joanne A.; Johnson, Peter M. Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes. *IMMUNOLOGY: Blackwell Publishing Ltd, Immunology*, 119, 522–528. 2006
37. Chul, Byung; Walz, Paul H.; Kennedy, George A.; Kapil, Sanjay. Biotype, Genotype, and Clinical Presentation Associated With Bovine Viral Diarrhea Virus (VDVB) Isolates From Cattle. *Intern J Appl Res Vet Med* • Vol. 3, No. 4, 2005

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

38. Coetzer, J.A.W., and Tustin R.C. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease, In: Potgieter LND (ed) Infectious disease of livestock, 2nd edition. 946pp. (94). 2004
39. Collett, Marc S.; Anderson, Dennis K.; Retzel, Ernest. Comparisons of the Pestivirus Bovine Viral Diarrhoea Virus with Members of the Flaviviridae. J. gen. Virol. (1988), 69, 2637-2643
40. Collett, Marc; Larson, Ruby; Belzer, Susan; Retzelt, Ernest. Proteins Encoded by Bovine Viral Diarrhoea Virus: The Genomic Organization of a Pestivirus. VIROLOGY 165, 208.1988
41. Córdova-Izquierdo, A., C.A. Córdova-Jiménez, M.S. Córdova-Jiménez, C.G. Ruiz Lang, J.A. Saltijeral Oaxaca, V.M. Xolalpa Campos, S. Cortés Suárez, J.M. Luque Rodríguez, M. Méndez Mendoza, R. Huerta Crispín, K. Arancibia Salinas, J.E. Guerra Liera. Seroprevalence of Viral Diseases in Cattle Meat Producer under Humid Tropical Conditions. Aust. J. Bas. Appl. Sci. 3(4): 4067-4070. 2009
42. Correa, Giron P.; Brown, L.N.; Bryner, J.H. Presencia de anticuerpos contra rinotraqueitis infecciosa, diarrea viral bovina, parainfluenza 3, brucelosis, leptospirosis, vibriosis y Haemophilus somnus en sueros de bovinos con problemas patológicos reproductores y respiratorios. Técnica Pecuaria en México 29, 26-33. 1975
43. Crespo, María del Pilar. El diagnóstico viral por el laboratorio. Colombia Médica Vol. 31 N° 3. 2000
44. Da Silva, N; Zardoya, R; Santurde, G; Solana, A; Castro, JM. Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhoea virus genome in semen. J Virol Methods. 55(2):209-18. 1995
45. Decaro, Nicola; Lucente, Maria Stella; Mari, Viviana; Cirone, Francesco; Cordioli, Paolo; Camero, Michele; Sciarretta, Rossana; Losurdo, Michele; Lorusso, Eleonora; Buonavoglia, Canio. Atypical Pestivirus and Severe Respiratory Disease in Calves, Europe. Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 17, No. 8. 2011
46. Domingo, E. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. Cell, 13 (4), 735-744. 1978
47. Dong-Kun, Yang; Byoung-Han, Kim; Chang-Hee, Kweon; Jeong-Kyu, Park; Ha-Young, Kim; Byung-Jae, So; In-Joong, Kim. Genetic Typing of Bovine

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

- Viral Diarrhea Viruses (VDVB) Circulating in Korea. *Journal of Bacteriology and Virology*. Vol. 37, No. 3 p.147 – 152. 2007
48. Donis, R. O., Corapi, W. V., Dubovi, E. J. Bovine viral diarrhoea virus proteins and their antigenic analyses. *Arch. Virol. Suppl.* 3: 29-40. 1991
 49. Donis, R. O., Corapi, W. V., Dubovi, E. J. Neutralizing Monoclonal Antibodies to Bovine Viral Diarrhoea Virus Bind to the 56K to 58K Glycoprotein. *J. gen. Virol.* 69, 77-86. 1988
 50. Donofrio, Gaetano; Bottarelli, Ezio; Sandro, Cavirani; Flammini, Cesidio Filippo. Expression of Bovine Viral Diarrhoea Virus Glycoprotein E2 as a Soluble Secreted Form in a Mammalian Cell Line. *Clin. Vaccine Immunol.* 13(6):698. 2006
 51. Elbers, Knut; Tautz, Norbert; Becher, Paul; Stoll, Dieter; Tillmann; Rügenapf, Thiel, Heinz-Jürgen. Processing in the Pestivirus E2-NS2 Region: Identification of Proteins p7 and E2p7. *JOURNAL OF VIROLOGY*. p. 4131–4135. 1996
 52. El-Hafeiz, Y.G.M. Abd; El-Hafeiz, M. Abd; Hassan, H.M. Molecular Characterization of the Isolated Strains of Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Global Veterinaria* 3 (5): 383-389, 2009
 53. Elsheikh, Abuelyazeed A. Effect of bovine viral diarrhoea virus on macrophages functions. 7th Vet. Med. Zag. Conference (21-23 July) 2004
 54. Escamilla H., Patricia; Martínez C, José Juan; Medina S, Mario; Morales, Elizabeth. Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, Mexico. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 71:314–317. 2007
 55. Fetzner, Christiane; Tews, Andrea; Meyers, Gregor. The Carboxy-Terminal Sequence of the Pestivirus Glycoprotein Erns Represents an Unusual Type of Membrane Anchor. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 11901–11913 Vol. 79, No. 18. 2005
 56. Fredriksen, B; Press CM, Løken T, Odegaard SA. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microbiology*; 64: 109-122. 1999
 57. Friedgut, Orly; Rotenberg, Ditzza; Brenner, Jacob; Yehuda, Stram; Paz, Rita; Nir, Alpert; Ram, Avi; Yadin, Hagay; Grummer, Beatrice. Description of the

- first acute bovine diarrhoea virus-2 outbreak in Israel. *The Veterinary Journal* 1-3. 2010
58. Fulton, Robert W; Ridpath, Julia F; Ore, Sharon; Confer, Anthony W; Saliki, J.T.; Burge, Lurinda J.; Payton, M.E. Bovine viral diarrhoea virus (VDVB) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: Distribution of VDVB1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Veterinary Microbiology* 111 pag. 35–40. 2005
 59. Fulton, Robert W.; Hessman, Bill E.; Ridpath, Julia F.; Johnson, Bill J.; Burge, Lurinda J.; Kapil, Sanjay; Braziel, Barbara; Kautz, Kira; Reck, Amy. Multiple diagnostic tests to identify cattle with Bovine viral diarrhoea virus and duration of positive test results in persistently infected cattle. *73:117–124. The Canadian Journal of Veterinary Research.* 2009
 60. Giammarioli, Monica; Pellegrini, Claudia; Casciari, Cristina; Rossi, Elisabetta; De Mario, Gian Mia. Genetic Diversity of Bovine Viral Diarrhoea Virus 1: Italian Isolates Clustered in at Least Seven Subgenotypes. *J Vet Diagn Invest* 20:783–788. 2008
 61. Giangaspero, Massimo; Harasawa, Ryô; Weber, Laura; Belloli, Angelo. Genoepidemiological Evaluation of Bovine viral diarrhoea virus 2 Species Based on Secondary Structures in the 5' Untranslated Region. *J. Vet. Med. Sci.* 70(6): 571–580, 2008
 62. Giangaspero, Massimo; Apicella, Claudio; Harasawa, Ryô. Palindromic nucleotide substitutions: A new software for pestivirus genotyping. *International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics (ISSN-2250-9941) Vol. 3(2) pp. 52-63.* 2013
 63. Glew, E. J.; Carr, B. V.; Brackenbury, L. S.; Hope, J. C.; Charleston, B.; Howard, C. J. Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *Journal of General Virology*, 84, 1771–1780. 2003
 64. Grooms DL. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*; 20(1):5-19. 2004
 65. Harada, Takashi; Tautz, Norbert; Thiel, Heinz-Jürgen. E2-p7 Region of the Bovine Viral Diarrhoea Virus Polyprotein: Processing and Functional Studies. *J. Virol.*, 74(20):9498. 2000

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

66. Hilton, Louise; Moganeradj, Kartykayan; Zhang, Gang; Chen, Yun-Hsiang; Randall, Richard E.; McCauley, John W.; Goodbourn, Stephen. The NPro Product of Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits DNA Binding by Interferon Regulatory Factor 3 and Targets It for Proteasomal Degradation. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 11723–11732. 2006
67. Houe, H.; Lindberg, A.; Moennig, V. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest* 18:427–436. 2006
68. Hulst, M. M.; Westra, D. F.; Wensvoort, G.; Moormann, R. J. M. Glycoprotein EI of Hog Cholera Virus Expressed in Insect Cells Protects Swine from Hog Cholera. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 5435-5442. 1993
69. Hsiung, G. D. Diagnostic virology: from animals to automation. *Yale J Biol Med* 57:727–733. 1984
70. Ilang Rondón. Diarrea viral bovina: Patogénesis e inmunopatología. *Rev. MVZ Cordoba* 11 (1): 694-704. 2006
71. Johnson, Craig M.; Perez, Daniel R.; French, Roy; Merrick, William C.; Donis, Ruben O. The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the α subunit of translation elongation factor-1. *Journal of General Virology*, 82, 2935–2943. 2001
72. Kabongo, Prudence Ngalula. The isolation and characterization of bovine viral diarrhoea viruses from cattle in South Africa, department of veterinary Tropical Diseases. Faculty of veterinary sciences. Tesis maestría. Universidad de Pretoria, South Africa. 2005
73. Kampa, Jaruan. Epidemiology of Bovine Viral Diarrhoea Virus and Bovine Herpesvirus type 1 Infections in Dairy Cattle Herds: Evidence of self-clearance and detection of infection with a new atypical pestivirus. Tesis Doctoral. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2006
74. Kim, S.G.; Dubovi, E.J. A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. *Biologicals*, 31, 103–106. 2003
75. Krey, Thomas; Anke; Himmelreich, Heimann, Manuela; Menge, Christian; Thiel, Heinz-Jürgen; Maurer, Karin; Rügenapf, Till. Function of Bovine CD46 as a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus Is Determined

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

- by Complement Control Protein. JOURNAL OF VIROLOGY. p. 3912–3922. 2006
76. Kuhne, S; Schroeder, C; Holmquist, G. Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle—testing tissue samples derived from ear tagging using an Erns capture ELISA. J Vet Med B 52:272–277. 2005
 77. Kupfermann, Heike; Thiel, Heinz-Jürgen; Dubovi, Edward J.; Meyers, Gregor. Bovine Viral Diarrhoea Virus: Characterization of a Cytopathogenic Defective Interfering Particle with Two Internal Deletions. JOURNAL OF VIROLOGY, p. 8175–8181. 1996
 78. Lackner, T.; Müller, A.; König, M.; Thiel, H.-J.; Tautz, N. Persistence of Bovine Viral Diarrhoea Virus Is Determined by a Cellular Cofactor of a Viral Autoprotease. JOURNAL OF VIROLOGY. p. 9746–9755. 2005
 79. Lai, Vicky C. H.; Kao, C. Cheng; Ferrari, Eric; Park, Justin; USS, Annette S.; Wright-Minogue, Jacquelyn; Hong, Zhi; Lau, Johnson Y. N. Mutational Analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. JOURNAL OF VIROLOGY, p. 10129–10136. 1999
 80. Lambot, Michel; Douart, Alain; Joris, Eliane; Letesson, Jean-Jacques; Pastoret, Paul-Pierre. Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. Journal of General Virology, 78, 1041–1047. 1997
 81. Larsson, Jenny. Inflammatory cytokines induced by Bovine Viral Diarrhoea Virus (VDVB) in Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) subsets. Tesis de licenciatura. Examensarbete inom veterinärprogrammet ISSN 1652-8697 Examensarbete 2010:57. Universidad de Uppsala. 2010
 82. Lazar, C.; Zitzmann, N.; Dwek, R. A.; Branza-Nichita N. The pestivirus E(rns) glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions. Virology 314: 696-705. 2003
 83. Leland, Diane S.; Ginocchio, Christine C. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. Clin. Microbiol. Rev. 20(1):49. 2007
 84. Lértora, W.J. Diarrea Viral Bovina: Actualización. Rev. Vet. FCV UNNE 14: 1. 2003

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

85. Letellier, C.; Kerkhofs, P. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virological Methods* 114 21–27. 2003
86. Lindenbach, Brett D; Thiel, Heinz-Jürgen; Rice, Charles M. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. Capítulo 33. *Fields Virology*, 5th Edition. D. M. Knipe and P. M. Howley, Eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 2007
87. Lunardi, M.; Headley, S.A.; Lisbôa, J.A.N.; Amude, A.M.; Alfieri, A.A. Outbreak of acute bovine viral diarrhoea in Brazilian beef cattle: Clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type VDVB strain subtype 1b. *Research in Veterinary Science* 85, 599–604. 2008
88. Machamer, Carolyn E.; Mentonet, Sue Ann; Rose, John K.; Farquhar, Marilyn G. The E1 glycoprotein of an avian coronavirus is targeted to the cis Golgi complex. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 87, pp. 6944-6948. 1990
89. Maurer, Karin; Krey, Thomas; Moennig, Volker; Thiel, Heinz-Jürgen; Rügenapf, Till. CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhoea Virus. *JOURNAL OF VIROLOGY*. p. 1792–1799. 2004
90. Mathapati, Basavaraj Shrishail; Mishra, Niranjana; Rajukumar, Katherukamem; Nema, Ram Kumar; Behera, Sthita Pragnya; Dubey, Shiv Chandra. Entry of bovine viral diarrhoea virus into ovine cells occurs through clathrin-dependent endocytosis and low pH-dependent fusion. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 46:403–407. 2010
91. Meléndez Soto; Rosa María; Valdivia Flores, Arturo Gerardo; Rangel Muñoz, Erika Janeth; Díaz Aparicio, Efrén; Segura-Correa, José C.; Guerrero Barrera, Alma Lilián. Factores de riesgo asociados a la presencia de aborto y desempeño reproductivo en ganado lechero de Aguascalientes, México. *Rev Mex Cienc Pecu*; 1(4):391-401. 2010
92. Murray, Catherine L.; Jones, Christopher T.; Rice, Charles M. Architects of Assembly: roles of Flaviviridae nonstructural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol*. September ; 6(9): 699–708. 2008
93. Murray, Catherine L. ; Marcotrigiano, Joseph; Rice, Charles M.. Bovine Viral Diarrhoea Virus Core Is an Intrinsically Disordered Protein That Binds RNA. *JOURNAL OF VIROLOGY*. p. 1294–1304. 2008

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

94. Meyer, C.; Von Freiburg, M.; Elbers, K.; Meyers, G. Recovery of virulent and RNase-negative Type 2 bovine viral diarrhoea viruses from infectious cDNA clones. *J. Virol.* 76: 8494-8503. 2002
95. Munoz-Zanzi, CA; Johnson, WO; Thurmond, MC; Hietala, SK. Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle. *J Vet Diagn Invest* 12:195–203. 2000
96. Polak, Miroslaw P.; Rola, Jerzy; Żmudziński, Jan F. Contamination of foetal bovine serum with bovine viral diarrhoea virus (VDVB). *Bull Vet Inst Pulawy* 52, 501-505, 2008
97. Omari, Kamel; Lourin, Oleg; Harlos, Karl; Grimes, Jonathan M.; Stuart, David I. Structure of a Pestivirus Envelope Glycoprotein E2 Clarifies Its Role in Cell Entry. *Cell Reports*, Volume 3, Issue 1, 30-35, 27. 2012
98. Parent, Romain; Qu, Xiaoyu; Petit, Marie-Anne; Beretta, Laura. The Heat Shock Cognate Protein 70 Is Associated with Hepatitis C Virus Particles and Modulates Virus Infectivity. *HEPATOLOGY*, Vol. 49, No. 6, 2009
99. Pellerin, Charles; Van den Hurk, Jan; Lecomte, Jacqueline; Tussen, Peter. Identification of a new group of Bovine Viral Diarrhoea Virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203, 260-268. 1994
100. Peterhans, Ernst; Jungi, Thomas W.; Schweizer, Matthias. VDVB and innate immunity. *Biologicals* 31: 107–111. 2003
101. Peterhans, Ernst; Bachofen, Claudia; Stalder, Hanspeter; Schweizer, Matthias. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (VDVB): Emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet. Res.* 41:44. 2010
102. PLM, PRONTUARIO DE ESPECIALIDADES VETERINARIAS PEV. DICCIONARIO DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS: Nombre comercial todos los fármacos y biológicos con la información técnica aprobada por la SAGARPA. Editorial: PLM, Edición: 32a Páginas: 752. 2012
103. Pogranichniy, Roman M.; Schnur, Megan E.; Raizman, Eran A.; Murphy, Duane A.; Negron, Maria; Leon, Thacker H. Isolation and Genetic Analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus from Infected Cattle in Indiana. *Veterinary Medicine International*, Volume 2011, Article ID 925910, 6 pages. 2011

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

104. Potgieter, L. Immunosuppression of cattle as a result of bovine viral diarrhea infection. *Agri. Pract.* 9: 7-14. 1988
105. Qu, Lin; McMullan, Laura K.; Rice, Charles M. Isolation and Characterization of Noncytopathic Pestivirus Mutants Reveals a Role for Nonstructural Protein NS4B in Viral Cytopathogenicity. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 10651–10662. 2001
106. Quadros, V.L.; Mayer, S.V.; Vogel, F.S.F. R. Weiblen; Brum, M.C.S. S., Arenhart; Flores, E.F. A search for RNA insertions and NS3 gene duplication in the genome of cytopathic isolates of bovine viral diarrhea virus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 39: 935-944. 2006
107. Ranjith-Kumar, C. T.; Gutshall, Les; Kim, Min-Ju; Sarisky, Robert T.; Kao, C. Cheng. Requirements for De Novo Initiation of RNA Synthesis by Recombinant Flaviviral RNA-Dependent RNA Polymerases. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 12526–12536. 2002
108. Reber, A.J.; Tanner, M.; Okinaga, T.; Woolums, A.R.; Williams, S.; Ensley, D.T.; Hurley, D.J. Evaluation of multiple immune parameters after vaccination with modified live or killed bovine viral diarrhea virus vaccines. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases.* 29:61–77. 2006
109. Reza, L.C. Impacto del virus de la diarrea viral bovina en la productividad de hatoslecheros. [on-line] Disponible en URL: <http://www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BtRgCliG0008.pdf> [citado Abril 2010]
110. Ridpath, J.F.; Bolin, S.R., Delayed onset of postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 VDVB, *Virology* 212: 259-262. 1995
111. Ridpath, Julia F.; Neill, John D.; Vilcek, Stefan; Dubovi, Edward J.; Carman, Suzanne. Multiple outbreaks of severe acute VDVB in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same VDVB2 strain. *Veterinary Microbiology* 114 : 196–204. 2006
112. Ridpath, J.F. Bovine viral diarrhea virus: global status. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 26(1): p. 105-21. 2010

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

113. Ridpath, Julia; Fulton, Robert; Kirkland, Peter; Neill, John D. Prevalence and Antigenic Differences Observed between Bovine Viral Diarrhea Virus Subgenotypes Isolated from Cattle in Australia and Feedlots in the Southwestern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 22: 184. 2010
114. Riedel, Christiane; Lamp, Benjamin; Heimann, Manuela; König, Matthias; Blome, Sandra; Moennig, Volker; Schüttler, Christian; Thiel, Heinz-Jürgen; Rügenapf, Tillmann. The Core Protein of Classical Swine Fever Virus Is Dispensable for Virus Propagation In Vitro. *PLoS Pathog* 8(3). 2012
115. Ronchi, J.I.; Estela, E.S.; M.R., Leunda; Odeón, A.C. Infección experimental con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) genotipo 2 en terneros con anticuerpos neutralizantes al VDVB genotipo 1. *ARCH. MED VET.* XXXIII, N° 2. 3-8. 2001
116. Rondón lang. Diarrea viral bovina: Patogénesis e inmunopatología. *Rev. MVZ Cordoba* 11 (1): 694 – 704. 2006
117. Ronecker, Saskia; Zimmer, Gert; Herrler, Georg; Greiser-Wilke, Irene; Beatrice Grummer. Formation of bovine viral diarrhoea virus E1–E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *Journal of General Virology*, 89, 2114–2121. 2008
118. Roux, Kenneth H. Optimization and Troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harb Protoc*; doi: 10.1101/pdb.ip66. 2009
119. Rügenapf, Tillmann; Unger, Gabi; Strauss, James H.; Thiel, Heinz-Jürgen. Processing of envelope glycoproteins of pestiviruses. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 67: 3288-3294. 1993
120. Saliki, JT; Dubovi, EJ. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 20(1):69-83. 2004
121. Sandvik, Torstein. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology* 64. 123-134. 1999
122. Sarıkaya, Baki; Azkur, Ahmet Kursat; Gazyagci, Serkal. Inactivated Bovine Viral Diarrhoea Virus Vaccine Trigger Leucopenia and Lymphopenia on Calves. *Acta Scientiae Veterinariae.* 39(4): 994. 2011

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

123. Sarikaya, Baki; Azkur, Ahmet; Kürşat, Gazyagci; Serkal, Aslan; Muhammet, Eren. Genetic Variability of Bovine Viral Diarrhea Virus in the 5'-UTR in the Central Anatolia of Turkey. *Acta Scientiae Veterinariae*, 40(1): 1013. 2012
124. Schirrmeier, Horst; Strebelow Günther, Depner, Klaus; Hoffmann, Bernd; Beer, Martin. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *Journal of General Virology*, 85, 3647–3652. 2004
125. Seago, Julian; Hilton, Louise; Reid, Elizabeth; Doceul, Virginie; Jeyatheesan, Janan; Moganeradaj, Kartykayan; McCauley, John; Charleston, Bryan; Goodbourn, Stephen. The Npro product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhoea virus uses a conserved mechanism to target interferon regulatory factor-3. *Journal of General Virology*, 88, 3002–3006. 2007
126. Segura-Correa, José C.; Solorio-Rivera, José L.; Sánchez-Gil, Laura G. Seroconversion to bovine viral diarrhoea virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in dairy herds of Michoacan, Mexico. *Trop Anim Health Prod* 42:233–238. 2010
127. Smirnova, Natalia P.; Ptitsyn, Andrey A.; Austin, Kathleen J.; Bielefeldt-Ohmann, Helle; Van Campen, Hana; Han, Hyungchul; van Olphen, Alberto L.; Hansen, Thomas R. Persistent fetal infection with bovine viral diarrhoea virus differentially affects maternal blood cell signal transduction pathways. *Physiol Genomics*. doi:10.1152/physiolgenomics.90276.2008
128. Solis-Calderon, J.J.; Segura-Correa, V.M.; Segura-Correa, J.C. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: Seroprevalence and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine* 72, 253–262. 2005
129. Ståhl, Karl; Alenius, Stefan. VDVB control and eradication in Europe —an update. *Japanese Journal of Veterinary Research* 60(Supplement): S31-S39, 2012
130. Stark, R., Meyers, G., Rumenapf, T., Thiel, H.-J. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.* 67: 7088-7095. 1993
131. Studer, Edgar; Bertoni, Guiseppe; Candrian, Urs. Detection and Characterization of Pestivirus Contaminations in Human Live Viral Vaccines. *Biologicals*. 30, 289–296. 2002

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

132. Suzan, Victor M.; Onuma, Misao; Aguilar, Romero E.; Murakam, Yosuke. Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhoea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico. *Jpn. J. Vet. Res.*, 31,125-132.1983
133. Tajima, M. Frey; H.-R., Yamato; Maede, Y.; Moennig, V.; Scholz, H.; Greiser-Wilke, I. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res.* 76: 31-42. 2001
134. Tan, Tolga; Karaoğlu, Taner; Erol, Nural; Yildirim, Yakup. Serological and Virological Investigations of Bovine Viral Diarrhoea Virus (VDVB) Infection in Dairy Cattle Herds in Aydin Province. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30 299-304. 2006
135. Tatusova, T. y Madden, T. BLAST 2 SEQUENCES, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiology Letters.* 174. 247-250. 1999.
136. Tautz, N.; Kaiser, A.; Thiel, H.-J. NS3 serine protease of bovine viral diarrhoea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology* 273: 351-363. 2000
137. Tautz, N., Meyers, G., Thiel, H.-J. Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. *Clin. Diagn. Virol.* 10: 121-127. 1998.
138. Tews, Birke Andrea; Schürmann, Eva-Maria; Meyers, Gregor. Mutation of Cysteine 171 of Pestivirus Erns RNase Prevents Homodimer Formation and Leads to Attenuation of Classical Swine Fever Virus. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 4823–4834. 2009
139. Thurner, Caroline; Witwer, Christina; Hofacker, L.; Stadler, Peter F. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *Journal of General Virology*, 85, 1113–1124. 2004
140. Uryvaev LV; Dedova, AV; Dedova, LV; Ionova, KS; Parasjuk, NA; Selivanova, TK; Bunkova, NI; Gushina, EA; Grebennikova, TV; Podchernjaeva, RJ. Contamination of cell cultures with bovine viral diarrhoea virus (VDVB). *Bull Exp Biol Med.* 153(1):77-81. 2012
141. Van Rijn, P. A., Gennip, H. G. P., Leendertse, C. H., Brusckke, C. J. M., Paton, D. J., Moormann, R. J. M., van Oirschot, J. T.. Subdivision of the

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

- pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology* 237: 337-348. 1997
142. Vargas, Diana S; Jaime, Jairo; Vera, Víctor J. Perspectivas para el control del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22: 677-688. 2009
 143. Vilcek, S., D.J. Paton, B. Durkovic, L. Strojny, G. Ibata, A. Moussa, A. Loitsch, W. Rossmanith, S. Vega, M.T. Scicluna, and V. Paifi. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Archives of Virology*. 146(1): p. 99-115. 2001
 144. Vilcek, Stefan; Greiser-Wilke, Irene; Nettleton, Peter; Paton, David J. Cellular insertions in the NS2-3 genome region of cytopathic bovine viral diarrhoea virus (VDVB) isolates. *Veterinary Microbiology* 77, 129-136. 2000
 145. Vilcek, S.; Herring, A. J.; Herring, J. A.; Nettleton, P. F.; Lowings, J. P.; Paton, D. J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 136:309-323. 1994. 2010
 146. Wegelt, Anne; Reimann, Llona; Zemke, Johanna; Beer, Martin. New insights into processing of bovine viral diarrhoea virus glycoproteins Erns and E1. *Journal of General Virology*, 90, 2462–2467. 2009
 147. Walz, P.H.; Grooms, D.L.; Passler, T.; Ridpath, J.F.; Tremblay, R.; Step, D.L.; Callan, R.J.; Givens, M.D. Control of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Ruminants. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24:476–486. 2010
 148. Webb, Brett Thomas. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in the bovine fetus: morphogenesis of skeletal lesions and innate immune response. Department of Biomedical Sciences. In partial fulfillment of the requirements For the Degree of Doctor of Philosophy Colorado State University Fort Collins, Colorado, Tesis Doctoral. 2012
 149. Weiland, Frank; Weiland, Emilie; Unger, Gabriele; Saalmüller, Armin; Thiel, Heinz-Jürgen. Localization of pestiviral envelope proteins Erns and E2 at the cell surface and on isolated particles. *Journal of General Virology*, 80, 1157–1165. 1999
 150. Weiner, C.M.; Smirnova, N.P.; Webba, B.T.; Van Campen, H.; Hansen, T.R. Interferon stimulated genes, CXCR4 and immune cell responses in

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

- peripheral blood mononuclear cells infected with bovine viral diarrhoea virus. Research in Veterinary Science. 2012
151. Welsh, M. D.; Adair, B. M.; Foster, J. C. Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 46, 195-210. 1995
 152. Wiskerchen, Maryann; Belzer, Susan K.; Collett, Marc S. Pestivirus Gene Expression: the First Protein Product of the Bovine Viral Diarrhoea Virus Large Open Reading Frame, p20, Possesses Proteolytic Activity. *JOURNAL OF VIROLOGY*. Vol. 65, No. 8.p. 4508-4514. 1991
 153. Xia, Hongyan; Vijayaraghavan, Balaje; Belák, Sándor, Liu, Lihong. Detection and Identification of the Atypical Bovine Pestiviruses in Commercial Foetal Bovine Serum Batches. *PLoS ONE* 6(12) 2011
 154. Xu, Jian; Mendez, Ernesto; Caron, Paul R.; Lin, Chao; Mark, A. Murcko; Collett, Marc S.; Rice, Charles M.. Bovine Viral Diarrhoea Virus NS3 Serine Proteinase: Polyprotein Cleavage Sites, Cofactor Requirements, and Molecular Model of an Enzyme Essential for Pestivirus Replication. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 5312–5322. 1997
 155. Young, N.J.; Thomas, C.J.; Collins, M.E.; Brownlie, J. Real-time RT-PCR detection of Bovine Viral Diarrhoea virus in whole blood using an external RNA reference. *Journal of Virological Methods* 138 218–222.2006
 156. Yu, Haiying; Grassmann, Claus; Behrens, Sven-Erik. Sequence and Structural Elements at the 39 Terminus of Bovine Viral Diarrhoea Virus Genomic RNA: Functional Role during RNA Replication. *JOURNAL OF VIROLOGY*. p. 3638–3648. 1999
 157. Yu, Haiying; Isken, Olaf; Grassmann, Claus; Behrens, Sven-Erik. A Stem-Loop Motif Formed by the Immediate 59 Terminus of the Bovine Viral Diarrhoea Virus Genome Modulates Translation as well as Replication of the Viral RNA. *JOURNAL OF VIROLOGY*. p. 5825–5835. 2000
 158. Zarkov, Iv; Jarullah, B. A. Comparative evaluation of two tests to determined antibodies against mucosal disease-viral diarrhoea. *Trakia Journal of Sciences*, Vol. 10, No 3, pp 53-57. 2012

IX. Anexos

Anexo 1. Registro de la patente MX/E/2012/081439, "Iniciadores para la identificación de virus del complejo respiratorio bovino mediante el uso de RT-PCR/PCR Multiplex en un solo tubo"

INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
 Dirección General de Patentes

Una vez revisado el Expediente y el Sub Expediente de la Solicitud de Patente y el Expediente de la Solicitud de Registro de la Marca se otorga el

Acta de otorgamiento de la Patente de Invencción

1. DATOS DEL INVENTOR

1.1 Nombre del inventor: El inventor es el solicitante El inventor no es el solicitante

1.2 Nombre de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

1.3 Representación del INVENTOR

1.4 Dirección postal, urbana y/o rural, código postal, número de teléfono y correo electrónico del INVENTOR

1.5 Nombre, Domicilio y País del INVENTOR

1.6 Nombre, Domicilio y País del REPRESENTANTE

2. DATOS DEL SOLICITANTE

2.1 Nombre: INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

2.2 Representación del SOLICITANTE

2.3 Dirección postal, urbana y/o rural, código postal, número de teléfono y correo electrónico del SOLICITANTE

2.4 Nombre, Domicilio y País del SOLICITANTE

2.5 Nombre, Domicilio y País del REPRESENTANTE

3. DATOS DEL OBJETO DE LA INVENCIÓN

3.1 Nombre de la INVENCIÓN

3.2 Dirección postal, urbana y/o rural, código postal, número de teléfono y correo electrónico del SOLICITANTE

3.3 Nombre, Domicilio y País del SOLICITANTE

3.4 Nombre, Domicilio y País del REPRESENTANTE

4. DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

4.1 Descripción de la Invencción

4.2 Fecha de divulgación previa

4.3 Clasificación Internacional

4.4 Fecha de presentación

4.5 Fecha de presentación

4.6 Fecha de presentación

4.7 Fecha de presentación

4.8 Fecha de presentación

4.9 Fecha de presentación

4.10 Fecha de presentación

4.11 Fecha de presentación

4.12 Fecha de presentación

4.13 Fecha de presentación

4.14 Fecha de presentación

4.15 Fecha de presentación

4.16 Fecha de presentación

4.17 Fecha de presentación

4.18 Fecha de presentación

4.19 Fecha de presentación

4.20 Fecha de presentación

4.21 Fecha de presentación

4.22 Fecha de presentación

4.23 Fecha de presentación

4.24 Fecha de presentación

4.25 Fecha de presentación

4.26 Fecha de presentación

4.27 Fecha de presentación

4.28 Fecha de presentación

4.29 Fecha de presentación

4.30 Fecha de presentación

4.31 Fecha de presentación

4.32 Fecha de presentación

4.33 Fecha de presentación

4.34 Fecha de presentación

4.35 Fecha de presentación

4.36 Fecha de presentación

4.37 Fecha de presentación

4.38 Fecha de presentación

4.39 Fecha de presentación

4.40 Fecha de presentación

4.41 Fecha de presentación

4.42 Fecha de presentación

4.43 Fecha de presentación

4.44 Fecha de presentación

4.45 Fecha de presentación

4.46 Fecha de presentación

4.47 Fecha de presentación

4.48 Fecha de presentación

4.49 Fecha de presentación

4.50 Fecha de presentación

4.51 Fecha de presentación

4.52 Fecha de presentación

4.53 Fecha de presentación

4.54 Fecha de presentación

4.55 Fecha de presentación

4.56 Fecha de presentación

4.57 Fecha de presentación

4.58 Fecha de presentación

4.59 Fecha de presentación

4.60 Fecha de presentación

4.61 Fecha de presentación

4.62 Fecha de presentación

4.63 Fecha de presentación

4.64 Fecha de presentación

4.65 Fecha de presentación

4.66 Fecha de presentación

4.67 Fecha de presentación

4.68 Fecha de presentación

4.69 Fecha de presentación

4.70 Fecha de presentación

4.71 Fecha de presentación

4.72 Fecha de presentación

4.73 Fecha de presentación

4.74 Fecha de presentación

4.75 Fecha de presentación

4.76 Fecha de presentación

4.77 Fecha de presentación

4.78 Fecha de presentación

4.79 Fecha de presentación

4.80 Fecha de presentación

4.81 Fecha de presentación

4.82 Fecha de presentación

4.83 Fecha de presentación

4.84 Fecha de presentación

4.85 Fecha de presentación

4.86 Fecha de presentación

4.87 Fecha de presentación

4.88 Fecha de presentación

4.89 Fecha de presentación

4.90 Fecha de presentación

4.91 Fecha de presentación

4.92 Fecha de presentación

4.93 Fecha de presentación

4.94 Fecha de presentación

4.95 Fecha de presentación

4.96 Fecha de presentación

4.97 Fecha de presentación

4.98 Fecha de presentación

4.99 Fecha de presentación

4.100 Fecha de presentación

17) Descripción a Título de la Invencción:

"INICIADORES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DEL COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO MEDIANTE EL USO DE RT-PCR/PCR MULTIPLEX EN UN SOLO TUBO".

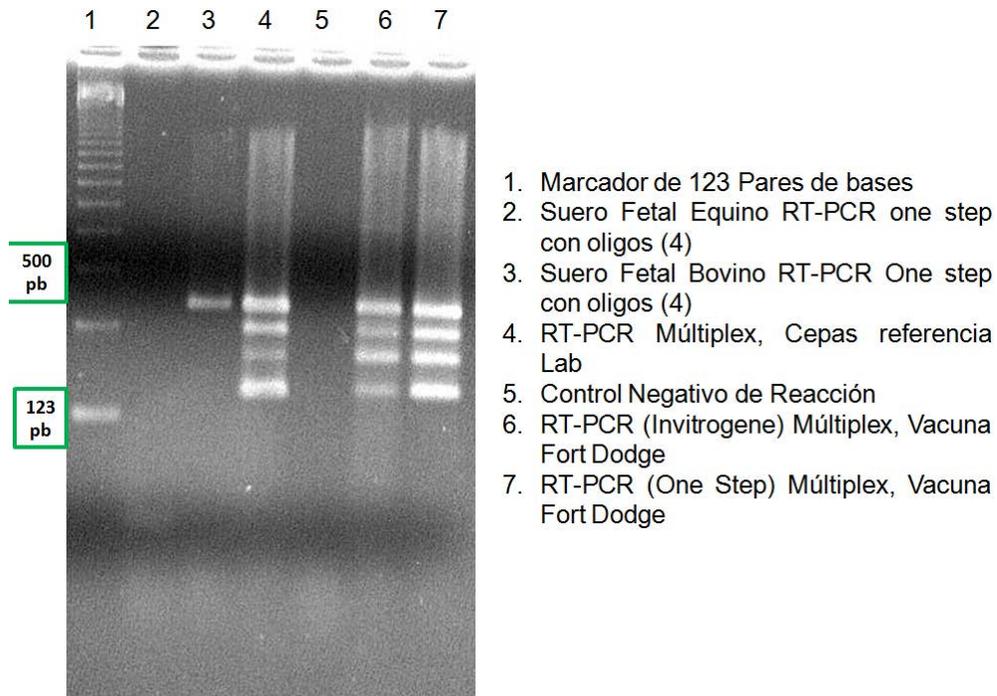
18) Fecha de divulgación previa

19) Clasificación Internacional

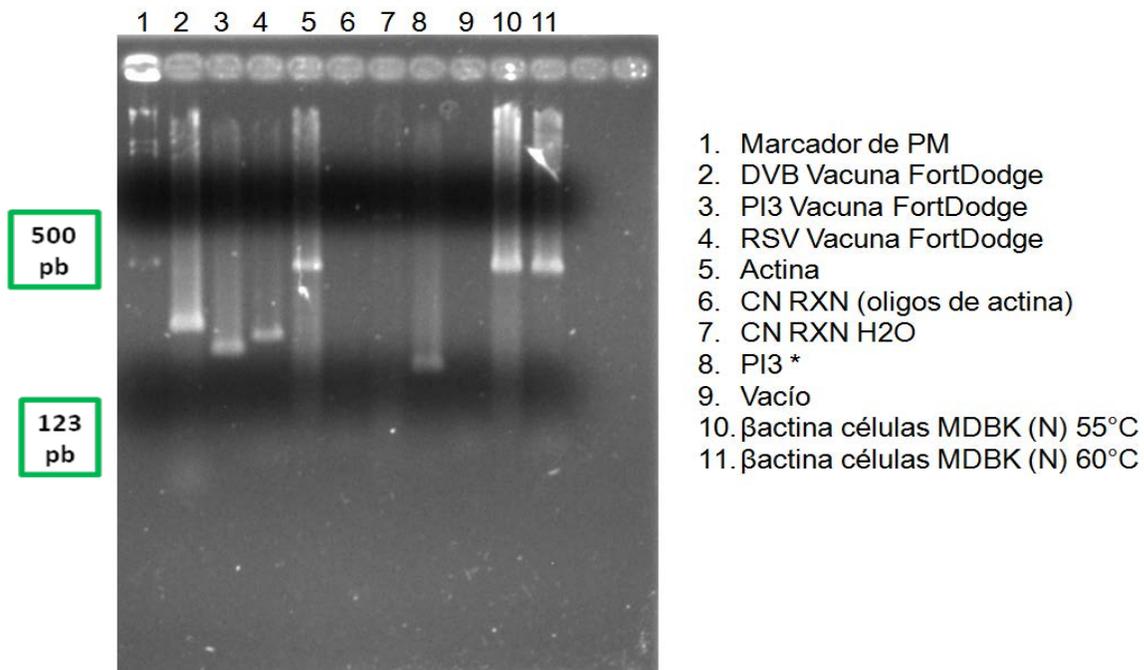
20) Fecha de presentación

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

Anexo 2. Separación por electroforesis de los productos de PCR del múltiplex, estandarizado con vacunas comerciales: MX/E/2012/081439.

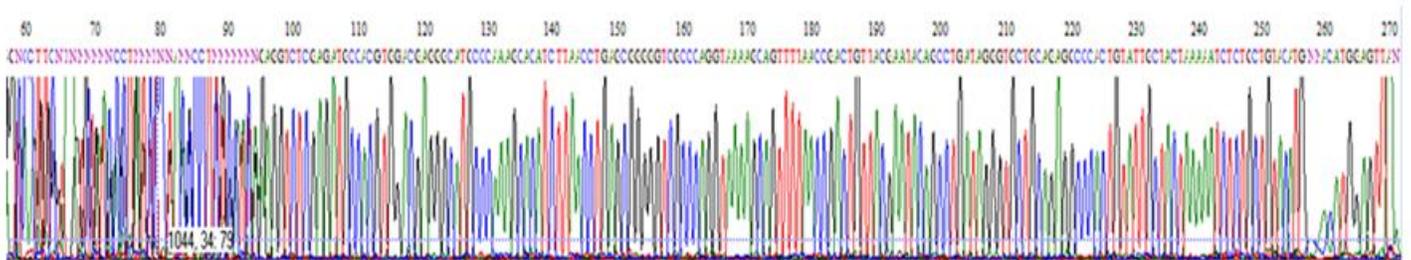


Anexo 3. Fraccionamiento electroforético de los productos de PCR del múltiplex: MX/E/2012/081439. Control de calidad del suero fetal equino, utilizado en los ensayos de infección.

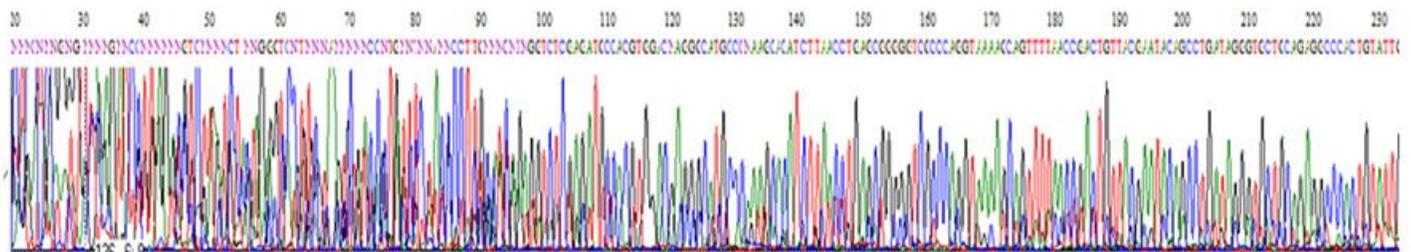


Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

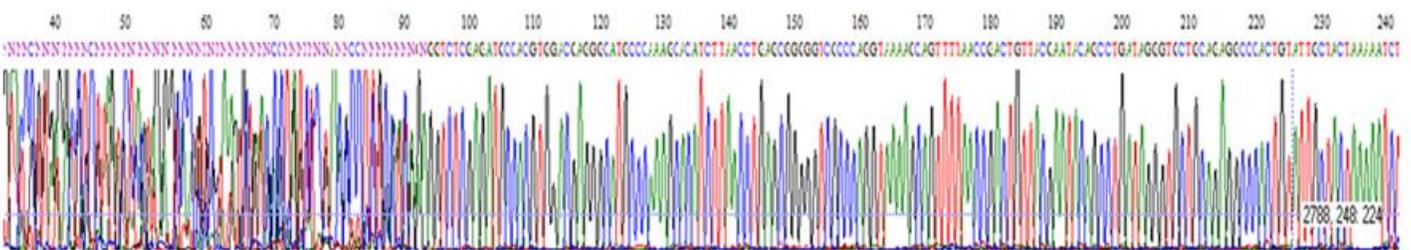
Anexo 4. Electroferogramas obtenidos de la secuenciación de los productos de PCR de la UTR 5' (Muestras: 01, 02, 03)



Electroferograma de la muestra 01



Electroferograma de la muestra 02



Electroferograma de la muestra 03

Lista de tablas

Tabla 1. Funciones que se han alterado de manera similar por virus CP, así como con NCP mientras que otros fueron influenciados en una forma específica dependiendo del biotipo (Adler <i>et al.</i> , 1996; Peterhans <i>et al.</i> , 2003).....	28
Tabla 2. Vacunas de virus activos, atenuados (PLM, 2012)	42
Tabla 3. Vacunas de virus inactivos (PLM, 2012)	43
Tabla 4. Componentes de la reacción de síntesis de cDNA método de transcriptor Roche.....	53
Tabla 5. Componentes de la reacción de síntesis de cDNA método de SuperScript™ II Reverse Transcriptase	54
Tabla 6. Secuencias y tamaño de fragmento esperados para los cebadores específicos de VDVB.....	60
Tabla 7. Componentes de la reacción del RT-PCR.....	63
Tabla 8. Componentes de la reacción de-PCR	64
Tabla 9. Resultados generales de los RT-PCR y PCR anidadas, genotipo en el que se agruparon las secuencias analizadas. Se muestra además el resultado de otros virus del complejo respiratorio, que fueron probados y el aislamiento viral..	85

Lista de figuras

Figura 1. Representación esquemática del VDVB y morfología viral (Coetzer y Tustin, 2004, Vargas <i>et al.</i> , 2009)	10
Figura 2. Organización genómica y longitud del VDVB (Collett <i>et al.</i> , 1988, Lindenbach <i>et al.</i> , 2007).....	11
Figura 3. Representación esquemática del orden de las proteínas estructurales y no estructurales, así como los sitios de procesamiento de cada una de ellas para dar como resultado proteínas maduras (Lindenbach <i>et al.</i> , 2007)	14
Figura 4. Entrada mediada por endocitosis vía clatrina (CME) se activa por la unión del virión a receptores. Proteínas adaptadoras se unen a la clatrina y la concentración local de éstas proteínas en la cara interna de la membrana plasmática, permite multimerizar a la clatrina para formar invaginaciones características (Clathrin-coated pit/CCP). Escisión de las proteínas de membrana DNM1/Dynamin-1, DNM2/Dynamin-2 pinchadoras, que liberan vesículas revestidas de clatrina (CCV), que posteriormente serán liberadas por Auxilina y	

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

Hsc70. Entra en contacto con el endosoma y vacía su contenido. El pH endosomal ácido y la unión al receptor generalmente induce modificaciones estructurales de las proteínas de superficie del virus que conduce a la penetración del genoma en el citoplasma a través de mecanismos de fusión o permeabilización (Modificado de expasy.org/viralzone). 22

Figura 6. Rearreglos del genoma asociados con la generación de virus CP. El inciso A, Indica un virus NCP típico y del inciso B al E, los 5 diferentes aislados generados por recombinación de RNA (Lindenbach *et al.* 2007). NADL, Osloss, and CP1 se han encontrado inserciones celulares dando como resultado el procesamiento de NS3. En el caso de Pe515CP and the CP9 DI RNA, Npro (caja negra) fue mediador del procesamiento de NS3. 26

Figura 7. Debido a su papel crucial en la respuesta innata, IRF3 es el objetivo de muchas proteínas virales. Algunas proteínas virales interactúan con IRF3 y evitan su fosforilación, mientras que en otros casos como VDVB el IRF3 es dirigido al proteosoma para su degradación (Chen *et al.*, 2007; expasy.org/viralzone) 30

Figura 8. Receptores Toll like y la activación del IFN, en respuesta de infección por virus de RNA (Larsson, 2010) 32

Figura 9. Diferentes síndromes ocasionados por la infección con VDVB. La infección posnatal es la forma clásica de la enfermedad, la cual resulta en infección subclínica o enfermedad severa. El desarrollo de la infección persistente se debe a la exposición al virus en el primer tercio de la gestación (Potgieter, 1988). 34

Figura 10. Posibles eventos producidos por la infección de diarrea viral bovina, durante la gestación bovina (Modificado de Rondón, 2006 y Downey *et al.*, 2009) 36

Figura 11. Diagrama de flujo, propagación y mantenimiento de la línea celular (Payment y Trudel, 1993) 47

Figura 12. Esquema de placa y diluciones realizadas para la titulación por DICT50 (Payment y Trudel, 1993) 50

Figura 13. Diagrama de flujo, aislamiento de virus a partir de tejido en la línea celular (Payment y Trudel, 1993) 58

Figura 14. Posición de los cebadores de la PCR UTR 5', con respecto a virus de diarrea viral bovina I, II y III 61

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

Figura 15. Posición de los cebadores de la PCR anidada Erns-E1, con respecto a secuencias reportadas en genbank, para diarrea viral I y II.	62
Figura 16. Programa del RT-PCR de UTR 5'	63
Figura 17. Programa del PCR, para la PCR anidada	65
Figura 18. A: Monocapa 90% de confluencia (48H) de la línea celular MDBK, B: Efecto citopático registrado en la línea celular MDBK a las 72 H p.i, 40X.....	68
Figura 19. Esquema del efecto citopático registrado en la placa de 96 pozos, para el cálculo del título viral del virus de referencia NADL ATCC.	69
Figura 20. Gráfico de Viabilidad estimada, registrada en los ensayos de viabilidad celular.....	70
Figura 21. (Gel agarosa al 0.7%, 80 Volts, TBE) Separación mediante electroforesis del RNA obtenido. Carriles 1-9: RNA obtenidos de monocapas de MDBK, infectadas con los virus NADL y SINGER.....	71
Figura 22. (Geles agarosa al 2%, 80 Volts, TBE). La figura muestra la amplificación de los fragmentos de 293 pb, a partir de las vacunas utilizadas. Separación mediante electroforesis de productos de PCR UTR 5'. A: Vacuna 1: 1. Marcador de 123pb, 2 VDVB, 3 y 4 βactina células MDBK 4. B: Vacuna 2: 1. VDVB, 2. Marcador de 123pb. C: Vacuna 3: 1. Marcador de peso molecular 50 pb, 2. BoHV1, 3 y 4: No se obtuvo amplificación de los virus de BRSV y PI3, en esa vacuna 5. VDVB, 6. Marcador de 123 pb. D. Vacuna 4: 1. Marcador de 123 pb, 3 y 4 No se obtuvo amplificación de los virus de BRSV y PI3, 5. VDVB.	72
Figura 23. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE). La figura muestra la amplificación de los productos esperados, para los virus de referencia. Separación mediante electroforesis de PCR correspondientes a la UTR 5'. 1: Marcador de 123 pb, 2: Espacio, 3: SINGER 48 hrs en MDBK. 4: NADL 48 hrs en MDBK, 5: SINGER 72 hrs en MDBK, 6: NADL 72 hrs en MDBK 7: Espacio 8: Control sin templado.....	72
Figura 24. La figura muestra los productos de amplificación para el VDVB y el BoHV1, además de la edad a la que fueron muestreados los animales, los cuales no fueron vacunados antes del muestreo. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE). Separación mediante electroforesis de los productos de PCR correspondientes a la UTR 5' del múltiplex, banda superior, bandas inferiores fragmentos correspondientes a BoHV1, fragmento de 159 pb. Muestras 1-21, se utilizó como control positivo a la cepa SINGER (S).	74

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

Figura 25. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE) La figura muestra los productos de amplificación obtenidos de lavados con PBS de muescas de oreja de todos los animales muestreados, en el gel B, se observan bandas inferiores que corresponden a iniciadores y productos inespecíficos de amplificación. Separación mediante electroforesis de productos de PCR correspondientes a la UTR 5'. A: 1:18, 2.espacio, 3:19, 4: espacio, 5: Virus de referencia (NADL), 6: Control sin templado, 7-13: 1-7, 14: Marcador de 123pb, B: 1: Control sin templado, 2: NADL, 3-10: 8-15, 11: Marcador 123 pb. C: 1: NADL, 2-7: 16-21, 8: Control sin templado, 9: Marcador de 123 pb 75

Figura 26. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE). La figura muestra los productos de amplificación obtenidos de muescas de oreja de todos los animales muestreados. Separación mediante electroforesis de productos de PCR correspondientes a la UTR 5'. A: Parte superior: Muestras 1- 9, Marcador de 100pb A: Parte inferior: Muestras 9-18, Marcador de 100pb B: 1-3: Muestras 19-21, 4: Control sin templado, 5: NADL 6: Marcador de 100 pb. 76

Figura 27. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE). La figura muestra los productos de amplificación obtenidos a partir de RNA de muescas de oreja de todos los animales muestreados. Parte superior: 1: Marcador de 100 pb, 2-13: Muestras 1-13. Parte inferior: 1: Marcador de 100 pb, 2-9: Muestras 14-21. 10: NADL. Se observan bandas inferiores que corresponden a iniciadores y productos inespecíficos Los productos de PCR corresponden al producto de la PCR anidada de 436pb, la muestra 03 amplificó un fragmento de menor tamaño, 8 muestras no amplificaron, debido a que no fue suficiente el DNA o son virus del genotipo 3, que no se incluyeron en el diseño de los iniciadores. 77

Figura 28. Monocapas de MDBK con efectos citopáticos a las 72 H p.i., en las que se colocaron las muescas de oreja seleccionadas, fueron observadas a 40X en microscopio invertido. La mayoría presentó desprendimiento y lisis celular, en otros casos vacuolización celular, semejante al efecto que produjo el virus de referencia NADL. Las monocapas que resultaron positivas al PCR se identifican con la estrella roja. 78

Figura 29. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE) Separación mediante electroforesis de los productos de PCR correspondientes a la UTR 5' de los virus que se logró aislar del pase 3, la figura muestra las muestras que inicialmente resultaron positivas a partir del RNA de las muestras sanguíneas. Gel izquierdo: 1: Muestra 2, 2: Muestra 3, 3: Muestra 4, 4: Muestra 5, 5: Muestra 6, 6: Muestra 7, 7: Muestra 8, 8:Muestra 9, 9:Muestra 11, 10: Marcador de 100 pb. Gel derecho: 1: Muestra 12, 2: Muestra 14, 3: Muestra 17, 4: Muestra 18, 5: Muestra 19, 6: Muestra 20, 7:.,

Tesis de Maestría: Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros

8: NADL, 9: Marcador de 100 pb, 10: Producto de amplificación para Herpes bovino..... 79

Figura 30. (Gel agarosa al 2%, 80 Volts, TBE) Separación mediante electroforesis de los productos de PCR correspondientes a la UTR 5' de los virus que se logró aislar del pase 4. 1: NADL (DVB), 2: Control sin templado, 3: Muestra 03, 4: Muestra 05, 5: Muestra 06, 6: Muestra 07, 7: Muestra 08, 8: Marcador 100 pb.... 79

Figura 31. Esquema del efecto citopático registrado en la placa de 96 pozos, para el cálculo del título viral de los aislados 03 y 05..... 80

Figura 32. Esquema del efecto citopático registrado en la placa de 96 pozos, para el cálculo del título viral de los aislados 06 y 07 80

Figura 33. Esquema del efecto citopático registrado en la placa de 96 pozos, para el cálculo del título viral del aislado 08. 81

Figura 34. Gráficos de densidades ópticas registradas en los ensayos de viabilidad celular para los virus aislados, encontrando que las señales más altas emitidas por el colorante correlacionan con un alto porcentaje de viabilidad celular debido al bajo título viral. 81

Figura 35. (E-Gel agarosa al 2%, TBE) Separación mediante electroforesis de productos de PCR purificados, correspondientes a la UTR 5' de muescas de oreja. Superior izquierda 1: Marcador de 123 pb, 2-10: Muestras 01-10, Superior derecha 1: Marcador de 123 pb, 2-10: Muestras 11-20, Inferior 1: Marcador de 123 pb, 2: Muestra 21, 3: NADL..... 82

Figura 36. (E-Gel agarosa al 2%, TBE) Separación mediante electroforesis de productos de PCR purificados, correspondientes a la Erns-E1 anidada a partir de muescas de oreja. Izquierdo 1: Marcador de 123, 2: Muestra 03, 3: Muestra 04, 4: Muestra 05, 5: Muestra 08, 6: Muestra 09, 7: Muestra 10, 8: Muestra 12, 9: Muestra 18. Derecho 1: Marcador de 123 pb, 2: Muestra 03, 3: Espacio, 4: Muestra 15, 5: Muestra 16, 6: Muestra 17, 7: Muestra 19..... 83

Figura 37. Árbol filogenético de UTR 5' construido en MEGA 5..... 84